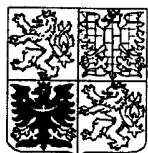


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287 614

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1997 - 371

(22) Přihlášeno: 10.08.1995

(30) Právo přednosti:
07.06.1995 US 1995/487459

(40) Zveřejněno: 15.10.1997
(Věstník č. 10/1997)

(47) Uděleno: 01.11.2000

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.01.2001
(Věstník č. 1/2001)

(86) PCT číslo: PCT/US95/10189

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 96/04916

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

A 61 K 31/56

A 61 K 31/225

A 61 K 31/685

A 61 P 31/00

(73) Majitel patentu:

SEPSICURE, L.L.C., Secaucus, NJ, US;

(72) Původce vynálezu:

Levine Daniel M., New York, NY, US;

Parker Thomas S., Brooklyn, NY, US;

Rubin Albert L., Englewood, NJ, US;

Gordon Bruce R., New York, NY, US;

Saal Start D., New York, NY, US;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1,
11000;

(54) Název vynálezu:

**Farmaceutický prostředek pro léčení
endotoxemie**

(57) Anotace:

Použití fosfolipidu pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení a prevenci toxicity způsobené endotoxinem. Prostředek neobsahuje proteiny a peptidy, a může navíc výhodně obsahovat například triglyceridy, jiné polární nebo neutrální lipidy, žlučové kyseliny nebo soli žlučových kyselin.

CZ 287614 B6

Farmaceutický prostředek pro léčení endotoxemieOblast techniky

5

Vynález se týká použití fosfolipidu prostého proteinů a peptidů pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení endotoxemie, související s endotoxiny. Zvláště se týká použití pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení takové otravy s obsahem sloučenin, které neutralizují a/nebo odstraňují endotoxiny z organismu a lze jej použít i pro prevenci těchto stavů.

10

Dosavadní stav techniky

15 Endotoxický šok je stav, často smrtelný, provokovaný uvolňováním lipopolysacharidů (LPS) z vnější membrány většiny gramnegativních bakterií (například *Escherichia coli*; *Salmonella typhimurium*). Struktura bakteriálních LPS byla již dobře objasněna včetně zvláštní molekuly, označované jako lipid A, která je připojena k acylovým řetězcům prostřednictvím glukosaminové kostry molekul lipidu A (viz Raetz, Ann. Rev. Biochem. 59: 129 - 170 (1990).

20 Molekula lipidu A slouží jako membránová kotva pro lipopolysacharidové struktury („LPS“) a je to LPS, který podmiňuje vývoj endotoxického šoku. Je třeba zdůraznit, že molekuly LPS jsou charakterizovány strukturou typu lipidu A a polysacharidovou částí. Tato poslední část se může v různých LPS v detailech molekuly lišit, ale zachovává si obecné strukturní motivy, charakteristické pro endotoxiny. Bylo by nesprávné uvádět, že molekula LPS je od bakterie
25 k bakterii stejná (viz Raetz výše). V oboru je běžné označovat různé molekuly LPS jako „endotoxiny“ a tento termín bude dále používán souhrnně pro označení molekul LPS.

V US patentu 5 128 318, zde uváděném jako referenčním, bylo předpokládáno, že rekonstituované částice, obsahující jak apolipoprotein spojený s HDL, tak i lipid, schopný vazby
30 na endotoxin a jeho inaktivace, by mohly být použity jako účinné materiály pro zmírnění endotoxicity, způsobené endotoxiny.

Ve starších dokumentech US č. 5 344 822, 5 674 855, 5 587 366 a 5 506 218; US č. 5 506 218; US patent 5 344 822 se uvádí, že pro léčení toxicity, způsobené endotoxiny, může být použito
35 různých jiných látek. Zvláště bylo zjištěno, že apolipoproteiny nejsou v rekonstituovaných částicích nutné, a že rekonstituovaná částice může obsahovat peptid a lipid, přičemž peptid není apolipoprotein.

Bylo rovněž zjištěno, že toxicita, způsobená endotoxiny, může být léčena postupným podáváním
40 buď apolipoproteinu nebo peptidu, po kterém následuje lipid. Po postupném podání se částice uspořádají do formy rekonstituovaných částic a potom odstraňují endotoxin.

Bylo také zjištěno, že alespoň někteří jedinci mají přirozeně úrovně apolipoproteinu, které jsou
45 vyšší než normální úrovně, takže účinné léčení endotoxemie může být provedeno podáváním rekonstituovaných částic, které neobsahují apolipoprotein nebo peptid, ale obsahují lipid podle přihlášky.

Navíc vynález, popisovaný v těchto přihláškách, zahrnoval použití rekonstituovaných částic
50 a zde diskutovaných složek pro prevenci endotoxinem způsobené toxicity podáváním účinného množství prostředku v případě potřeby prevence. Léčené subjekty zahrnují pacienty, trpící infekcemi nebo v rekonvalescenci po chirurgickém zákroku. Tito pacienti mají někdy velmi nízké hladiny HDL v plazmě, někdy pouze 20 % normální úrovně. V těchto případech je pro včasnou prevenci pomocí HDL nanejvýš žádoucí, aby byla tato nízká hladina vykompenzována.

Nyní bylo zcela překvapivě zjištěno, že fosfolipidy mohou být použity samostatně nebo v kombinaci s dalšími látkami, jako jsou neutrální lipidy, choláty apod., jako účinné prostředky pro zmírnění a/nebo prevenci endotoxemie.

5

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je tedy použití fosfolipidu prostého proteinů a peptidů pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení nebo prevenci endotoxemie nebo sepse u člověka nebo zvířete.

10

Další provedení vynálezu zahrnuje použití fosfolipidu podle spolu s kyselinou cholanovou nebo solí kyseliny cholanové a/nebo neutrálním lipidem.

15

Zvláště výhodné je použití fosfatidylcholinů (dále označovány „PC“), buď samostatně, nebo v kombinaci s dalšími fosfolipidy, jako jsou sfingolipidy, v prostředcích, které v podstatě neobsahují peptidy a proteiny, jako apolipoproteiny nebo od nich odvozené peptidy. Pokud se prostředky používají ve formě intravenózních jednorázových dávek, neutrální lipidy, jako jsou mono-, di-, a triglyceridy je možno kombinovat s fosfolipidy, pokud celkové množství neutrálních lipidů je pod určitou úrovní. Pokud se neutrální lipidy podávají jinými formami, jako například intravenózně infuzí, jejich obsah není tak kritický, ale je třeba ho brát v úvahu.

20

Zvláště výhodná provedení vynálezu zahrnují emulze, kde se spolu s fosfolipidem a neutrálním lipidem používá žlučová kyselina nebo sůl žlučové kyseliny.

25

Je zde ukázána účinnost žlučových kyselin a solí žlučových kyselin, tedy cholátů, při léčení endotoxemie. Žlučové kyseliny je možno používat samostatně nebo v kombinaci s jedním nebo více fosfolipidy a/nebo neutrálními lipidy, jako je fosfatidylcholin a nebo triglycerid.

30

Vynález umožňuje zmírnění nebo prevenci endotoxemie u pacienta podáváním účinné dávky fosfolipidu, s kterým se endotoxin spojuje. Fosfolipid spojený s endotoxinem je potom z těla odstraněn standardními biologickými způsoby, které se neliší od normálních v oboru známých způsobů odstraňování lipoproteinových částic. Spojení endotoxinu s fosfolipidem endotoxin inaktivuje.

35

Jak bude ukázáno v příkladech, pro dosažení stejného účinku jako u fosfolipidů, tj. léčení a prevence endotoxemie, je možno také podávat některou látku z rodiny kyselin cholanových nebo solí kyselin cholanových, jako je kyselina žlučová nebo sůl kyseliny žlučové. Pro léčení endotoxemie tedy mohou být použity prostředky, neobsahující peptidy a proteiny, ve kterých je přítomna žlučová kyselina, sůl žlučové kyseliny nebo obě látky. Kyseliny cholanové se popisují např. v: Hofmann, Hepatology 4(5): 4S-14S (1984), která se zde uvádí jako reference.

40

Léčeným subjektem je zejména člověk, ale vynález je možno také použít ve veterinárním lékařství.

45

Termín „zmírnění“ se zde používá pro léčení, které snižuje zátěž endotoxemií, způsobenou některým z produkovaných endotoxinů, například gramnegativních bakterií (*S. typhimurium*, *E. coli* atd.). Prevenci je možno provádět podáváním prostředku v okamžiku, kdy jedinec je nebo pravděpodobně bude v situaci, kdy může dojít k expozici endotoxinem. To se klasicky vyskytuje v průběhu chirurgického zákroku. Jedinec, který se má podrobit chirurgickému výkonu, tedy může dostat aktivní složku jako přípravu na výkon.

50

Účinné množství kombinace fosfolipidu a žlučové kyseliny, nutné pro léčení pacienta, může být různé. Obecně se dává přednost dávce od 200 až do přibližně 800 mg fosfolipidu na kg tělesné hmotnosti, avšak množství může být nižší nebo vyšší v závislosti na vážnosti endotoxemie nebo stupni rizika ve vztahu k prevenci. Pro kyseliny cholanové a jejich soli, jako jsou žlučové kyseliny a jejich soli, se používá dávka od přibližně 10 mg až do přibližně 300 mg na kg tělesné hmotnosti, lépe 15 mg až přibližně 275 mg na kg tělesné hmotnosti.

Je žádoucí podávat žlučovou kyselinu nebo soli žlučové kyseliny a fosfolipidy v prostředcích, které také obsahují neutrální lipidy, ale není to nezbytné, protože emulze bez neutrálních lipidů se pravděpodobně budou vyskytovat také. Požadavek na kombinované podávání fosfolipidů vyplývá ze skutečnosti, že se neutrální lipidy a fosfolipidy spojují do částic, které se podobají lipoproteinům, ale liší se od nich tím, že neobsahují žádné proteinové nebo peptidové složky, které jsou samozřejmě v lipoproteinech vždy přítomny.

Zvláště vhodnými formami léčení jsou ty, kde fosfolipidem je fosfatidylcholin, jako např. fosfatidylcholin vaječného žloutku, fosfatidylcholin ze sóji nebo sfingolipid. Jako žlučová kyselina nebo sůl žlučové kyseliny je výhodná kyselina cholová a/nebo její soli, jako je cholát sodný, deoxycholát sodný a chenodeoxycholát sodný. Co se týče neutrálních lipidů, je výhodné používat ester cholesterolu nebo triglycerid, ale mohou být také použity jiné neutrální lipidy, jako je skvalen nebo jiné uhlovodíkové oleje, dia monoglyceridy a antioxidanty⁷, jako je vitamin E.

Ve výhodném provedení prostředek obsahuje sfingosin.

Lze použít různých forem podávání prostředků, přičemž zvláště výhodná je jednorázová injekce nebo jiné intravenózní formy. Pokud se použije forma jednorázové injekce, a prostředek obsahuje triglycerid, musí se věnovat určitá pozornost dávkování. Je totiž poměrně dobře známo, že triglyceridy jsou toxické, když se podávají v příliš velké dávce. Odborník s obvyklou zkušeností v oboru však může snadno sestavit prostředek tak, aby bylo riziko otravy triglyceridem sníženo nebo odstraněno. Obecně, pokud se používá formy jednorázové injekce, by prostředky neměly obsahovat více než 80 hmotnostních procent triglyceridu nebo jiného neutrálního lipidu, s výhodou ne více než 70 % hmotnostních z celkového prostředku. Nejvýhodněji by prostředky k podávání jednorázovou injekcí neměly obsahovat více než 50 % hmotnostních neutrálního lipidu z celkového prostředku, jako například od 5 do 10 % hmotnostních z celkového prostředku.

Když se však použije jiné intravenózní formy, než je jednorázová injekce, riziko otravy je sníženo. I pro intravenózní nebo i ostatní formy podávání jsou nicméně výše uvedené rozsahy výhodné, i když ne nezbytné. Pro žlučové kyseliny a soli žlučových kyselin se dávky s výhodou pohybují od přibližně 25 mg/kg tělesné hmotnosti až do přibližně 500 mg/kg tělesné hmotnosti, přičemž zvláště výhodné jsou dávky od přibližně 50 mg/kg tělesné hmotnosti do přibližně 100 mg/kg tělesné hmotnosti. Pro fosfolipidy jsou výhodné dávky od přibližně 100 mg/kg tělesné hmotnosti až do přibližně 1000 mg/kg tělesné hmotnosti. Zvláště výhodná dávka fosfolipidu je až do 400 mg, s výhodou 200 mg a zvláště 100 mg na kg tělesné hmotnosti. Uvedené dávky jsou obecně použitelné, avšak budou se lišit v závislosti na pacientovi a způsobu podávání.

Jak je uvedeno výše, prostředky bez proteinů a peptidů vyžadují přítomnost alespoň jednoho fosfolipidu nebo žlučové kyseliny/soli žlučové kyseliny. V případě fosfolipidů je výhodné, aby byl přítomen alespoň jeden neutrální lipid, jako je triglycerid, diglycerid nebo monoglycerid. Prostředky mohou obsahovat další materiály, jako jsou steroly (např. cholesterol, β -sitosterol), esterifikované nebo neesterifikované lipidy (např. ester cholesterolu nebo neesterifikovaný cholesterol), uhlovodíkové oleje, jako je skvalen, antioxidanty jako je vitamin E, avšak tyto látky

nejsou nezbytné. V takovém prostředí může být samozřejmě použito více než jednoho fosfolipidu a/nebo více než jednoho neutrálního lipidu. Pokud se používá kombinací neutrálního lipidu a fosfolipidu, neutrální lipid by měl být přítomen v koncentraci od přibližně 3 % až do přibližně 50 % hmotnostních vzhledem k celkovému množství lipidu v prostředí.

5

Zvláště výhodný hmotnostní poměr fosfolipidu k neutrálnímu lipidu je 93 : 7.

V případě žlučových kyselin/solí žlučových kyselin je možno je použít odděleně nebo v kombinaci s fosfolipidem, neutrálním lipidem nebo oběma. S ohledem na tyto další materiály (např. fosfolipidy a neutrální lipidy) jsou výhodné výše uvedené látky. Je možno popř. použít další sloučeniny z výše uvedených.

10

Součástí vynálezu jsou také prostředky, použitelné pro léčení endotoxemie. Jedním z provedení vynálezu v této skupině je prostředek, obsahující alespoň jednu látku ze skupiny žlučová kyselina /sůl žlučové kyseliny, fosfolipid a neutrální lipid, přičemž prostředek jako celek obsahuje množství látky, které umožní zmírnit endotoxemii. Tento prostředek s výhodou obsahuje (v % hmotnostních) od přibližně 5 % do přibližně 30 % žlučové kyseliny/soli žlučové kyseliny, od přibližně 3 % do přibližně 50 % neutrálního lipidu a od přibližně 10 % do přibližně 95 % fosfolipidu. Zvláště výhodné jsou prostředky, obsahující od přibližně 10 do 15 % hmotnostních žlučové kyseliny/soli žlučové kyseliny, od přibližně 5 % do přibližně 10 % hmotnostních neutrálního lipidu a zbytek tvoří fosfolipid.

15

20

Zvláště výhodné je použití, kde hmotnostní poměr kyseliny cholanové nebo soli kyseliny cholanové, fosfolipidu a neutrálního lipidu je 13 : 81 : 6.

25

Je třeba zdůraznit, že tato hmotnostní procenta se vztahují na prostředky, skládající se ze tří složek. Když je tříložkový systém kombinován např. s nosičem, pomocnou látkou a případnými výše uvedenými látkami, procento vztažené na celý prostředek tím poklesne. Dále je třeba zdůraznit, že tyto farmaceutické prostředky jsou vždy bez proteinů a peptidů.

30

V případě prostředků, které neobsahují žlučovou kyselinu nebo sůl žlučové kyseliny takové prostředky bez proteinů a peptidů s výhodou obsahují alespoň přibližně 3 % hmotnostní neutrálního lipidu, až do přibližně 50 % hmotnostních neutrálního lipidu, přičemž zbytek tvoří alespoň jeden fosfolipid. Neutrální lipid je s výhodou triglycerid, ale může jím být jakýkoliv z dalších neutrálních lipidů, které se uvádějí výše. Fosfolipidem také může s výhodou být fosfatidylcholin.

35

Další aspekty vynálezu budou odborníkovi v oboru jasné a není třeba je zde dále rozvádět.

Následující příklady a specifikace je nutno pokládat za ilustrativní a v žádném případě nemají předkládaný vynález omezovat; další provedení v rámci podstaty vynálezu jsou pak odborníkům v oboru samozřejmé.

45 Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1A a 1B ukazuje výsledky, pro testování různých prostředků na modelu, přičemž byla určována neutralizace endotoxinu pomocí uvolňování TNF v úplné lidské krvi.

50 Obr. 1A ukazuje úlohu proteinu a obr. 1B úlohu fosfolipidu. Testovanými sloučeninami jsou přirozené lipoproteiny a (VLDL, LDL, HDL), rekonstituovaný HDL (R-HDL) a prostředky INTRALIPID®, stejně jako emulze s obsahem fosfolipidu a proteinu.

- Obr. 2A a 2B srovnávají úlohu triglyceridu (neutrálního lipidu) a fosfatidylcholinu, fosfolipidu, na stejném modelu.
- 5 Obr. 3 ukazuje toxicitu způsobenou podáním různých prostředků PC a PC/TG na myším modelu s použitím modelu s 55 % letalitou, přičemž se podává LPS E. coli.
- Obr. 4 ukazuje data, která je možno porovnat s testem s úplnou lidskou krví výše, ale s použitím fosfolipidu s neesterifikovaným cholesterolem, sfingomyelinem nebo směsí obou na místě triglyceridů.
- 10 Obr. 5A a 5B ukazují výsledky, porovnatelné s výsledky na obrázcích 1A a 1B s tím rozdílem, že v nových obrázcích je fosfolipid, neesterifikovaný cholesterol a/nebo sfingomyelin smíchán s triglyceridy nebo esterifikovaným cholesterolem jako neutrálním tukem.
- 15 Obr. 6 porovnáva výsledky získané s použitím esteru cholesterolu a emulzí s obsahem triglyceridu na myším modelu in vivo.
- Obr. 7 ukazuje prostředky podle vynálezu teoretická množství triglyceridů uvolněná do krve po podání různých TG, s vyznačenou úrovní toxicity.
- 20

Příklady provedení vynálezu

Seznam použitých zkratk:

- 25 PC fosfatidylcholin
 TG triglyceridy
 CA žlučová kyselina nebo její sůl
 VLDL, LDL, HDL přirozené lipoproteiny plazmy
 R-HDL rekonstituovaný HDL
- SP sfingomyelin
 C cholesterol neesterifikovaný
 CE cholesterol esterifikovaný
 LPDS sérum s nedostatkem lipoproteinů
- 30

Příklad 1

- 35 Faktory, které ovlivňují stimulaci faktoru TNF- α prostřednictvím LPS při zachování integrity interakce mezi proteiny plazmy a krevními elementy, je možno vhodně studovat in vitro v systému úplné lidské krve. Stejný systém byl použit k určení, která z lipoproteinových složek je důležitá při neutralizaci LPS.
- 40 Testovanými materiály byly rekonstituované proteiny s vysokou densitou (R-HDL), přirozené lipoproteiny plazmy (VLDL, LDS, HDL), sérum s nedostatkem lipoproteinů (LPDS) a 20 % emulze INTRALIPID®, bohatá na triglyceridy (směs triglyceridů a fosfolipidů).
- Krev byla odebírána do heparinizované zkumavky, zředěna roztokem Hank's Balanced Salt Solution (dále „HBSS“) nebo testovaným materiálem, rozpuštěným v HBSS. Výsledný materiál byl přenesen do zkumavek Starstedt (250 μ l/zkumavku). LPS bylo rozpuštěno v apyrogenním fyziologickém roztoku, obsahujícím 10 mM HEPES, a přidáno (2,5 μ l) na konečnou koncentraci 10 ng/ml. Po čtyřhodinové inkubaci při 37 °C byly zkumavky ochlazeny na 4 °C a centrifugovány při 10 000 g po dobu 5 minut. Supernatant byl sebrán a testován na TNF- α s použitím komerčního testu ELISA.
- 50

Následující tabulka 1 ukazuje srovnání prostředků, složených z testovaných materiálů. Obrázky 1A a 1B ukazují výsledky. Data jsou ukázána jako množství produkovaného TNF- α , vynesného

proti koncentraci přidaného proteinu (obr. 1A) a fosfolipidu (obr. 1B). Bylo použito logaritmického měřítka pro zobrazení širokého rozsahu použitých koncentrací, přičemž 10° odpovídá 1 mg/ml. Všechny inkubace úplné krve obsahovaly 10 ng/ml LPS E. coli 0111:B4, doplněný

5

Fakt, že se materiály liší v účinnosti při vneseném obsahu proteinu (obr. 1A), přičemž jsou velmi podobné když je vnesen obsah fosfolipidu (obr. 1B) ukazují na to, že fosfolipid je důležitou složkou.

10

Toto je potvrzeno zjištěním, že bezproteinová emulze lipidu je účinnější než přirozený HDL, ale méně účinná než R-HDL. Zdá se, že protein není pro neutralizaci důležitý.

Tabulka 1 : Složení přirozených lipoproteinů a rekonstituovaného HDL

15

Lipoprotein		TC	TG	PC	Protein
Třída	Hustota (g/ml)	% hmotnostní			
VLDL	<1,006	22	53	18	7
LDL	1,007-1,063	48	11	22	20,9
HDL	1,063-1,21	18	8	22	52
R-HDL	1,063-1,21	-	-	79	21
LPDS	>1,21	0	0	2	98
Intralipid	-	1	93	6	0

Příklad 2

20

V dalším kroku byly testovány v úplné lidské krvi bezproteinové emulze lipidů, obsahující různá množství neutrálního lipidu. Bylo použito stejného testu na úplné lidské krvi in vitro, jak je uvedeno v příkladu 1.

25

Všechny popisované částice byly připraveny podle stejného protokolu, který zahrnoval mísení fosfolipidu, sfingomyelinu nebo fosfatidylcholinu, trioleinu a/nebo neesterifikovaného esteru cholesterolu, rozpuštěného v chloroformu, a navázení do lahvičky. Jako antioxidant byl přidán vitamin E (0,02 % hmotnost/objem). Potom byl připraven film suchého lipidu přeháněním suchého plynného dusíku nebo argonu přes vzorek. Potom byl do lahvičky přidán jeden objem apyrogenního fyziologického roztoku a lahvičkou bylo mícháno na mixéru, dokud nebyl všechen lipid suspendován. Roztok byl potom homogenizován ve vysokotlakém homogenizátoru. Vzorky, obsahující fosfatidylcholin (PC) s nebo bez trioleinu byly homogenizátorem cyklovány desetkrát při tlaku 136 MPa. Vzorky s obsahem esteru cholesterolu s jedním nebo více dalšími lipidy byly cyklovány 15 - 20 x při tlaku 204 MPa. Homogenizované roztoky byly filtrovány stříkačkou s filtrem 0,45 µm a filtrát byl až do použití (během 3 dnů) skladován při pokojové teplotě. Získané výsledky ukazují obrázky 2A a 2B. V těchto studiích je vynesena produkce LPS - dependentního TNF-α proti koncentraci přidaného triglyceridu (obr. 2A) nebo fosfolipidu (obr. 2B). Prostředky, jak je uvedeno v popisu obrázku, obsahovaly (v procentech hmotnostních) 7 % triglyceridu („TG“), 45 % TG, 89 % TG, 94 % TG, R-HDL nebo fosfolipid bez TG (ukázáno jen v obr. 2B). Prostředek s 89 % TG je s 10 % INTRALIPID[®]em, zatímco 94 % TG se vztahuje k 20 % INTRALIPIDU. Ve všech ostatních testech bylo použito vaječného fosfatidylcholinu (PC) a trioleinu.

35

40

Tyto výsledky ukazují, že bezproteinové prostředky, srovnávané ve vztahu k obsahu triglyceridu, jsou velmi odlišné. Tyto prostředky jsou si však velmi podobné, pokud jsou

testovány vzhledem k obsahu fosfolipidu (PC). To potvrzuje úlohu fosfolipidu, zejména pokud je účinný samotný fosfolipid, ale v menší míře to nastává u emulzí, obsahujících až do 45 % TG.

5 Příklad 3

Práce potom pokračovala na experimentech in vivo na myším modelu, který je považován za spolehlivý systém pro předpovídání u lidí.

- 10 V těchto experimentech byla myším podána jednorázová injekce dostatečných množství výše popsaných prostředků stejně jako dalších prostředků (čistý fosfatidylcholin, 7 % TG, 25 % TG, 45 % TG, 71 % TG, 81 % TG, 89 % TG a 94 % TG) nebo kontroly s fyziologickým roztokem pro vytvoření dávky fosfolipidu (buď 200 mg/kg, nebo 400 mg/kg) spolu s 25 mg/kg LPS E. coli 0111:B4. Kontrolní skupina dostala intravenózně fyziologický roztok ve stejném množství jako
15 objem emulze. Přežívání po 72 hodinách je uvedeno v obr. 3. Ze 344 zvířat v kontrolních skupinách přežilo 155.

- Samotný PC má mírný ochranný účinek, při míře spolehlivosti 95 % statisticky nevýznamný, zatímco prostředky s obsahem TG 7 %, 45 % a 71 % výrazně zlepšovaly přežití. Prostředky s obsahem 80 % a 89 % TG byly účinné pouze částečně, zatímco 94 % TG přežití snižovalo.
20

Když byla dávka zvýšena až na 400 mg/kg PC, jak 89 %, tak i 94 % emulze TG významně snižovaly dobu přežití, pravděpodobně kvůli otravě TG, jak bude vysvětleno dále.

25

Příklad 4

- Práce, popisovaná v příkladech 1 - 3 ukázala, že fosfolipidy jsou aktivním prostředkem, působícím při inhibici endotoxemie. Fakt, že nepolární lipidy jiné než triglyceridy mohou tvořit
30 emulze s fosfolipidy jinými než PC naznačuje, že mohou být vyzkoušeny také ostatní lipidy. Jako příklady uvádíme sfingomyelin (další fosfolipid) a neesterifikovaný cholesterol (polární neutrální lipid) a jejich směsi. Mohou tak být také použity esterifikovaný cholesterol (nepolární ester), skvalen (uhlovodík) a vitamin E (nepolární antioxidant). Pro jejich testování byla navržena řada experimentů s užitím úplné lidské krve (viz příklad 1) a testu přežívání myši (viz
35 příklad 3).

- Výše uvedeným způsobem byly připraveny emulze s použitím čistého fosfatidylcholinu, fosfatidylcholinu s 10 % hmotnostními neesterifikovaného cholesterolu, 10 % hmotnostními sfingomyelinu nebo celkově 10 % směsi obou. Emulze byly k úplné krvi přidávány
40 v koncentraci 100 mg/dl vzhledem k PC a 10 ng/ml LPS. Směs byla inkubována a bylo měřeno uvolňování TNF- α .

- Výsledky ukazuje obr. 4. Produkce TNF- α byla podstatně redukována již samotným PC. Uvolňování TNF- α potlačovaly rovněž emulze s obsahem neesterifikovaného cholesterolu, sfingomyelinu nebo směsi obou.
45

Příklad 5

- 50 Pro určování vlivu neesterifikovaného cholesterolu a nebo sfingomyelinu na emulze s obsahem neutrálního lipidů byl také použit test s úplnou krví. Emulze byly opět přidávány v koncentraci 100 mg/dl PC. V následující tabulce 2 jsou uvedeny různé prostředky (v % hmotnostních).

Tabulka 2

Emulze	Složení
PC s 45 % TG	55 : 45
PC + TG + C	54,4 : 45,3 : 0,3
PC + TG + SP	51,6 : 43,0 : 5,4
PC + TG + C + SP	51,4 : 42,9 : 0,3 : 5,4
PC + CE	54,5 : 45,5
PC + CE + C	54,4 : 45,3 : 0,3
PC + CE + SP	51,6 : 43,0 : 5,4
PC + CE + C + SP	51,5 : 42,9 : 0,3 : 5,4

5 Výsledky jsou ukázány v obrázcích 5A a 5B. Emulze PC, připravené vždy s neutrálním lipidem, s nebo bez dalších polárních lipidů, měly inhibiční účinek. Byla použita opět koncentrace LPS 10 ng/ml, která klinicky odpovídá koncentraci endotoxinu. Emulze, obsahující ester cholesterolu, mají menší účinnost než emulze s obsahem TG, zatímco emulze s obsahem neesterifikovaného cholesterolu nepotlačují TNF- α stejně jako emulze, které ho neobsahují. Zdá se, že přídavek sfingomyelinu k emulzím zlepšil potlačení produkce TNF- α .

10

Příklad 6

15 Emulze, obsahující ester cholesterolu, byly testovány na modelu in vivo, použitým v příkladu 3, s letální dávkou endotoxinu. Byly připraveny emulze s obsahem PC a TG nebo PC a esteru cholesterolu (CE), které byly podávány v jednotlivé dávce 200 mg/kg PC spolu s 25 mg/kg E. coli 0111:B4 LPS (smrtná dávka) ocasní cévou. Kontrolní skupiny dostaly intravenózně stejný objem fyziologického roztoku. V obrázku 6 jsou porovnány výsledky pro emulze, obsahující CE a TG. Každá emulze byla testována minimálně ve dvou experimentech s použitím 16 a více zvířat.

20

Jak je ukázáno, emulze s obsahem 7 % nebo 45 % CE (% hmotnostní) významně zlepšovaly přežití. Tyto výsledky spolu s výsledky podle příkladu 5 ukazují, že CE může být nahrazeno TG za vytvoření emulzí, které neutralizují endotoxin.

25

Příklad 7

30 Bezproteinové emulze fosfolipidu s triglyceridem účinně blokují produkci TNF- α v úplné krvi, stimulovanou LPS. Teoreticky mohou být také tyto emulze účinné in vivo, jestliže je možno je bezpečně podávat v dávkách, které vytvoří ochranné koncentrace fosfolipidu v plazmě. Naše předchozí experimenty s R-HDL ukazují, že minimální dávka fosfolipidu je přibližně 200 mg/kg. S použitím této dávky a objemu plazmy, která tvoří 4,5 % tělesné hmotnosti, lze vypočítat koncentraci triglyceridu, očekávanou v plazmě, po podání řady emulzí se stoupajícím obsahem triglyceridu. Výsledek ukazuje obr. 7 jako hladkou čáru, která se zakřivuje vzhůru se stoupajícím hmotnostním % TG. Koncentrace TG v plazmě u zdravých dospělých zřídka překročí 1000 mg/dl dokonce i po tučném jídle. U pacientů s koncentrací TG v plazmě nad 2000 mg/dl je hlášena pankreatitida (Farmer, a další, Amer. J. Med. 54: 161 - 164 (1973); Krauss, a další, Amer. J. Med. 62: 144 - 149 (1977); Glueck, a další, J. Lab. Clin. Med. 123: 59 - 61). Koncentrace TG nad 4000 mg/dl je extrémně vzácná a svědčí o vážném stavu. Poslední dvě hladiny jsou na obrázku označeny vodorovnými čarami. Podání buď 10 % nebo 20 % INTRALIPID®u v dávce, která poskytne 200 mg/kg fosfolipidu, má zvýšit koncentrace TG v plazmě (viz dva prázdné kroužky) s jistotou nad bezpečné meze. Naopak podání emulzí, které

40

obsahují 7 %, 45 %, 71 % nebo 78 % (plné čtverce zleva doprava) zvýší koncentraci TG v plazmě na 136, 477, 1300 nebo 2000 mg/dl. Emulze s obsahem TG až do přibližně 50 % by neměly být z hlediska TG toxické.

5

Příklad 8

Ve stejném typu experimentů, který se uvádí v předcházejících příkladech, byla testována účinnost kombinací fosfolipidu a žlučové kyseliny, tj. cholátu sodného.

10

Způsob, kterým byly připravovány prostředky, podávané testovacím zvířatům, však byl odlišný.

V tomto příkladu a v následujících příkladech byly prostředky připravovány s použitím vysokotlakého homogenizátoru Microfluidizer. Tento přístroj umožňuje zvětšení měřítka.

15

Kapalný triolein nebo kapalný sojový triglycerid byly navázeny do vhodného množství vody nebo vody, obsahující 9 mM, 18 mM nebo 36 mM cholát sodný. Na papír byl navážen pevný granulovaný fosfatidylcholin a potom pomalu za míchání přidáván k roztoku. Pro dispergování lipidu je vždy potřebná doba 3 až 5 minut. Po dispergaci byly materiály nality do homogenizátoru. Zařízení používá pro pohon čerpadla hydraulického tlaku a dva paprsky vzorku jsou směřovány proti sobě. Tlak může dosáhnout až 170 MPa. Po srážce jsou paprsky protlačovány tryskou ve tvaru kříže a tím se roztok homogenizuje.

20

Vzorky byly recirkulovány homogenizátorem, přičemž jeden průchod je definován jako čas, který potřebuje čerpadlo k protlačení celého vzorku přístrojem. Pro dosažení homogenního vzorku byl vzorek cirkulován dvacetkrát. Byla přidána dextróza do konečné koncentrace 5 %.

25

Při pokojové teplotě byly smíseny endotoxin, vyčištěný z *E. coli* 0111:B4 (40 mg/kg) a emulze, která je diskutována dále (200 mg fosfatidylcholinu/kg) byly smíseny a ihned podány intravenózní injekcí ocasní cévou myším C57BL6/J (hmotnost mezi 19 a 30 g). Myši, kterým byl podáván samotný cholát, dostávaly objem cholátu sodného stejný jako objem emulze přípravku cholát/EML při stejné koncentraci cholátu. Kontrolní myši dostávaly stejný objem 5 % dextrózy, aby byla zachována osmolalita plazmy.

30

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3, která následuje. Emulze fosfatidylcholinu a 7 % triglyceridu, popsána v předcházejících příkladech. Pokud byl použit cholát sodný, byl přidáván v uvedených koncentracích k surovým materiálům před jejich emulgací.

35

Tabulka 3: Ochrana myši před letální dávkou endotoxinu

40

Čas	Kontrola	7 % TG	7 % TG + CA			18 mM CA	
			9 mM	18 mM	36 mM	bez PC nebo TG	+ PC
h	Počet přeživších (N)						
0	28	28	8	16	8	8	8
24	9	12	4	15	8	8	8
48	5	10	2	15	8	8	8
72	2	5	1	15	8	8	8
96	1	0	1	15	8	7	8

Dále udáváme hmotnostní procenta v emulzích. Při použití 9 mM cholátu jsou hmotnostní procenta vzhledem k emulzi: 7 % cholátu, 6,1 % triglyceridu a 86,9 % fosfatidylcholinu. Při použití 18 mM cholátu jsou hmotnostní procenta vzhledem k emulzi: 13,1 % cholátu, 5,7 %

triglyceridu a 81,2 % fosfatidylcholinu. Při použití 36 mM cholátu jsou hmotnostní procenta vzhledem k emulzi: 23,2 % cholátu, 5 % triglyceridu a 71,8 % fosfatidylcholinu.

5 Je třeba zdůraznit, že v těchto experimentech podávané množství LPS (40 mg/kg) je mnohem vyšší než množství používané pro studium letality v předcházejících experimentech. Účelem těchto vyšších dávek je překrýt jakýkoliv ochranný vliv, který by bylo možno připsat fosfatidylcholinu a nebo triglyceridu. Závěr, který by měl vyplynout z těchto experimentů je ten, že existuje ochranný účinek, který lze přičíst soli žlučové kyseliny, cholátu sodnému.

10 Nejsou zde uvedeny studie, prováděné s použitím jiných solí žlučové kyseliny a solí žlučové kyseliny s obsahem taurinu. Další příklady žlučových kyselin jsou alodeoxycholová kyselina, lithocholová kyselina, hyodeoxycholová kyselina, hyocholová kyselina, α , β a ω - muricholové kyseliny, murodeoxycholová kyselina, ursodeoxycholová kyselina,ursocholová kyselina a všechny jejich soli jako jsou soli sodné nebo konjugáty s taurinem nebo glycinem (viz
15 Hoffmann, výše).

Příklad 9

20 Dále bylo studováno přežívání při použití myší jako pokusných zvířat.

V této studii byla pokusná zvířata rozdělena do čtyř skupin. První skupina dostala roztok 5 % dextrózy a byla použita jako kontrolní. Druhá skupina dostala emulzi 93 % hmotnostních fosfatidylcholinu a 7 % hmotnostních triglyceridu, připravených jak je uvedeno výše. Emulze
25 obsahovala 5 % dextrózu a sojové fosfolipidy v množství přibližně 50 mg/ml lipidu. Ve třetí a čtvrté skupině byla zvířatům podána podobná emulze jako druhé skupině, doplněná buď 18 mM cholátem sodným, nebo 18 mM deoxycholátem sodným. V tomto experimentu bylo použito stejného protokolu jako v příkladu 8.

30 Přežívání bylo měřeno 72 hodin po podání a je uvedeno v následující tabulce:

Tabulka 4: Účinek přídatku žlučové kyseliny k 7 % emulzi triglyceridu na 72 hodinové přežívání myší.

Skupina		N	Přežití %	Hodnota p ve skupině		
				1	2	3
1	5 % dextróza	28	4	-	-	-
2	7 % TG	64	8	NS	-	-
3	cholát sodný + 7 % TG	16	94	0,00001	0,00001	-
4	deoxycholát sodný + 7 %TG	8	75	0,0001	0,00001	NS

35

NS = nebylo stanoveno

Při porovnání přežití byla statistická významnost mezi skupinami testována generalizovanou Wilcoxonovou metodou s použitím počítačového programu. Porovnání se skupinou 1 kontroly jsou
40 uvedena v řádce „1“, porovnání se skupinou 2, ošetřenou 7 % emulzí jsou uvedena v řádce „2“ a porovnání se skupinou 3, léčenou emulzí s cholátem sodným jsou uvedena v řádce „3“.

Jak procento přežití, tak i statistická analýza jasně ukazují neočekávanou převahu prostředků s obsahem žlučové kyseliny.

Příklad 10

5 Ve druhé sérii experimentů bylo jako modelu použito králíka. V tomto modelu se určovalo uvolňování TNF- α (tumor necrosis factor).

10 Králíci byli rozděleni do tří skupin a dostali 5 % roztok dextrózy, emulzi fosfolipidu a triglyceridu (93 % / 7 %), jak je diskutováno výše, nebo emulzi 93 % / 7 % s obsahem 18 mM kyseliny cholové. Koncentrace dextrózy byla u všech emulzí nastavena na 5 %, jako v příkladu 9. Králíci dostali uváděcí dávku emulze a o 2 hodiny později jim bylo podáno 100 μ g LPS E. coli 0111:B4. Po uváděcí dávce byly prostředky podávány intravenózně průběžnou infuzí rychlostí 50 mg lipidu na kg tělesné hmotnosti za hodinu. Intravenózní podávání pokračovalo 3 hodiny po podání LPS.

15 Králíkům byla odebírána krev před začátkem experimentu, 30 minut po podání uváděcí látky a v hodinových intervalech v průběhu 5 hodin po podání.

20 V následující tabulce jsou uvedeny špičkové hodnoty TNF- α . Těch bylo dosaženo 2 hodiny po podání endotoxinu.

Byla určována statistická významnost za použití známého Studentova testu. Jak je v tabulce ukázáno, po podání 18 mM kyseliny cholové došlo k podstatnému snížení hladiny TNF- α .

25 Tabulka 5 Účinek emulze na produkci TNF- α u králíka

Emulze	TNF- α	Významnost	
	ng/ml	N	p
Kontrola 5 % dextróza	134 \pm 70	9	
Emulze 7 % TG	68 \pm 5	5	<0, 05
Emulze 7 % TG + 18 mM kys. cholové	39 \pm 20	4	<0, 01

30 PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití fosfolipidu prostého proteinů a peptidů pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu nebo prevenci endotoxemie nebo sepse u člověka nebo zvířete.
- 35 2. Použití fosfolipidu podle nároku 1 spolu s kyselinou cholanovou nebo solí kyseliny cholanové a/nebo neutrálním lipidem.
3. Použití podle nároku 2, kde kyselinou cholanovou nebo solí kyseliny cholanové je kyselina žlučová nebo sůl kyseliny žlučové.
- 40 4. Použití podle nároku 3, kde sůl kyseliny žlučové je zvolena ze skupiny cholát sodný, deoxycholát sodný a chenodeoxycholát sodný.
- 45 5. Použití podle nároku 4, kde solí žlučové kyseliny je cholát sodný.
6. Použití podle některého z nároků 1 až 5, kde fosfolipidem je fosfatidylcholin.

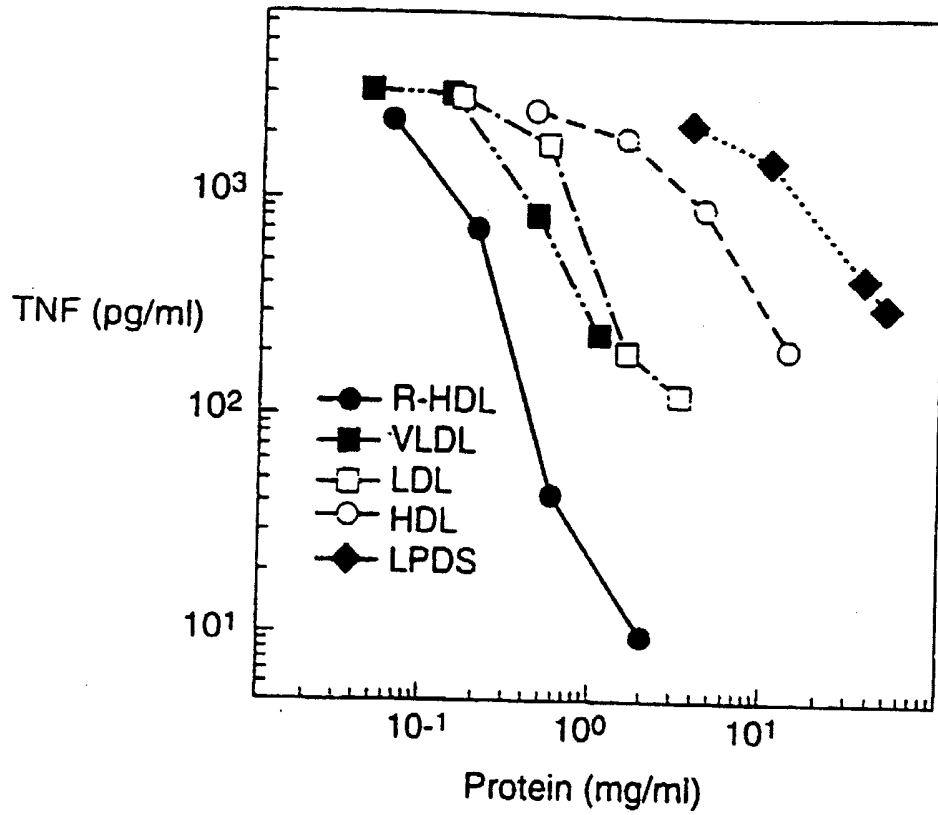
7. Použití podle některého z nároků 1 až 5, kde fosfolipidem je sfingolipid.
8. Použití podle některého z nároků 2 až 7, kde neutrálním lipidem je triglycerid.
- 5 9. Použití podle některého z nároků 2 až 7, kde neutrálním lipidem je ester cholesterolu.
10. Použití podle některého z nároků 2 až 9, kde farmaceutický prostředek obsahuje až do 70 % hmotnostních z celkového prostředku neutrálního lipidu.
- 10 11. Použití podle některého z nároků 2 až 10, kde farmaceutický prostředek obsahuje až do 50 % hmotnostních z celkového prostředku neutrálního lipidu.
12. Použití podle některého z nároků 2 až 11, kde farmaceutický prostředek obsahuje od 5 % do 15 10 % hmotnostních z celkového prostředku neutrálního lipidu.
13. Použití podle některého z nároků 2 až 12, kde hmotnostní poměr fosfolipidu k neutrálnímu lipidu je 93 : 7.
- 20 14. Použití podle některého z nároků 2 až 13, kde farmaceutický prostředek obsahuje od 5 % hmotnostních do 30 % hmotnostních kyseliny cholanové nebo soli kyseliny cholanové.
15. Použití podle některého z nároků 2 až 14, kde farmaceutický prostředek obsahuje od 10 % hmotnostních do 25 15 % hmotnostních z prostředku kyseliny cholanové nebo soli kyseliny cholanové.
16. Použití podle nároku 2, kde hmotnostní poměr kyseliny cholanové nebo soli kyseliny cholanové, fosfolipidu a neutrálního lipidu je 13 : 81 : 6.
- 30 17. Použití podle nároku 16, kde fosfolipidem je fosfatidylcholin, neutrálním lipidem je triglycerid a kyselinou cholanovou nebo soli kyseliny cholanové je cholát sodný.
18. Použití podle některého z nároků 1 až 17 pro výrobu farmaceutického prostředku obsahujícího v dávkové jednotce až do 400 mg, s výhodou 200 mg a zvláště 100 mg fosfolipidu 35 na kg tělesné hmotnosti.
19. Použití podle některého z nároků 1 až 18 ,kde prostředek obsahuje
- 40 a) alespoň jeden neutrální lipid v množství od 3 % do 50 % hmotnostních celkového lipidu, a
b) alespoň jeden fosfolipid.
20. Použití podle nároku 19, kde fosfolipidem je fosfatidylcholin.
21. Použití podle nároku 19, kde fosfolipidem je sfingolipid.
- 45 22. Použití podle nároků 19 až 21, kde neutrálním lipidem je triglycerid.
23. Použití podle některého z nároků 19 až 21, kde neutrální lipid zahrnuje ester cholesterolu.
- 50 24. Použití podle některého z nároků 19 až 23, kde prostředek dále obsahuje sfingosin.

25. Použití podle některého z nároků 19 až 24, kde prostředek je ve formě pro intravenózní podávání.

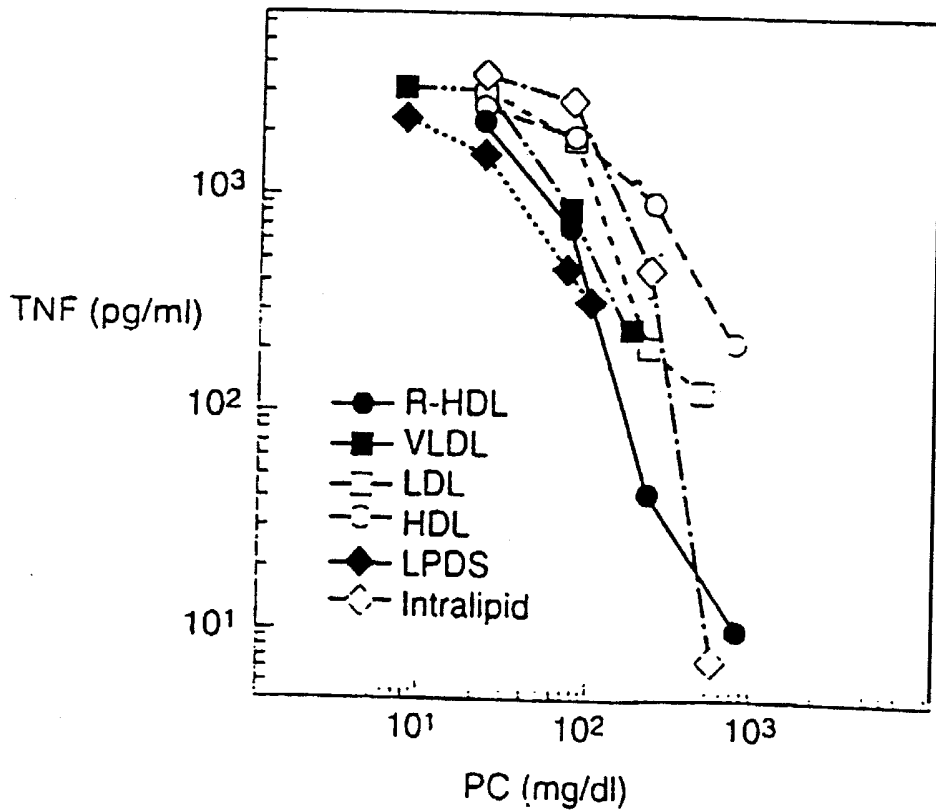
5

7 výkresů

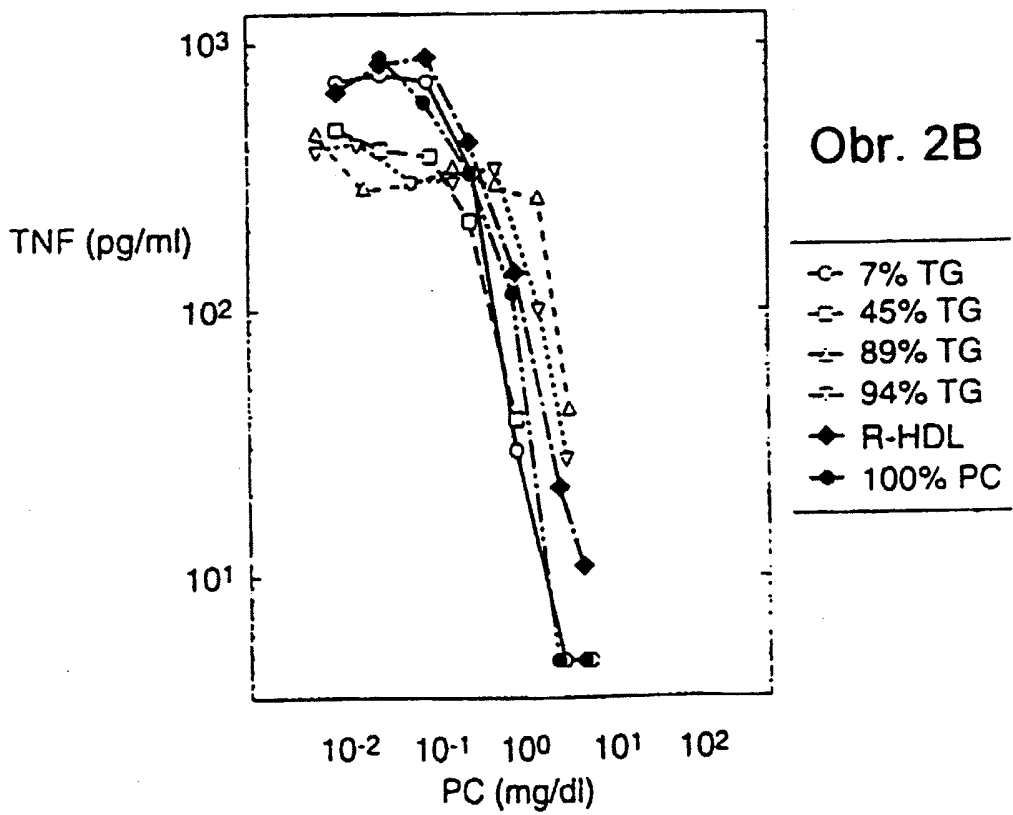
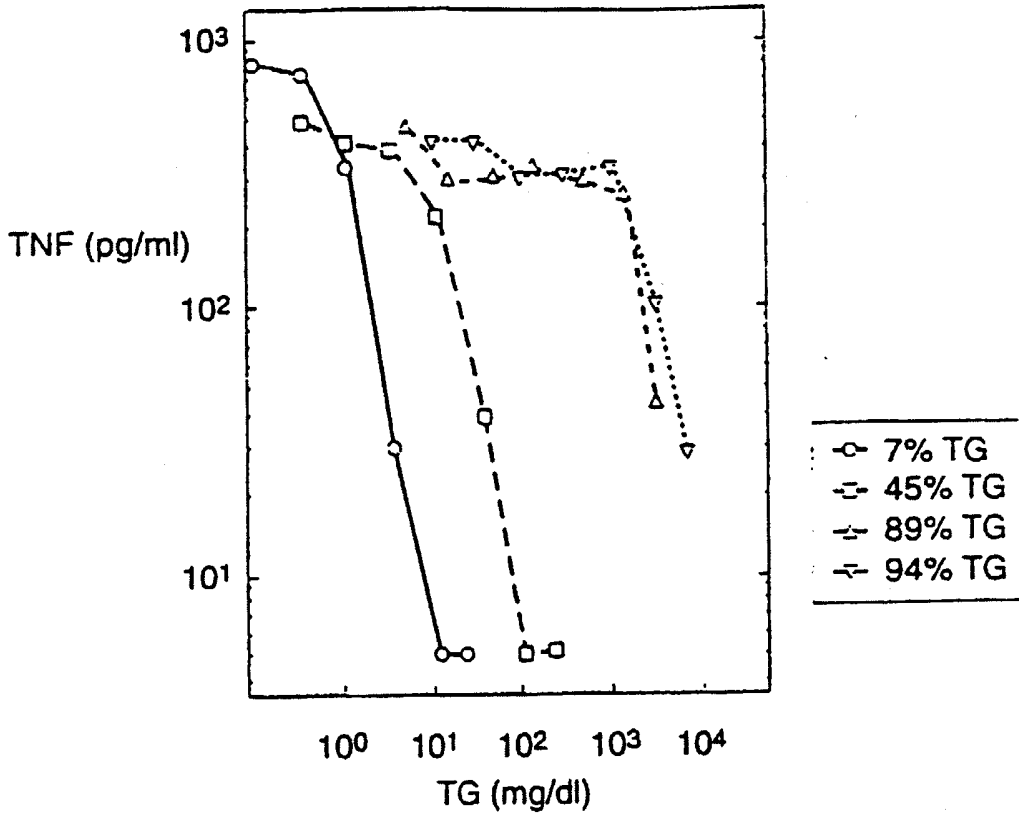
Obr. 1A



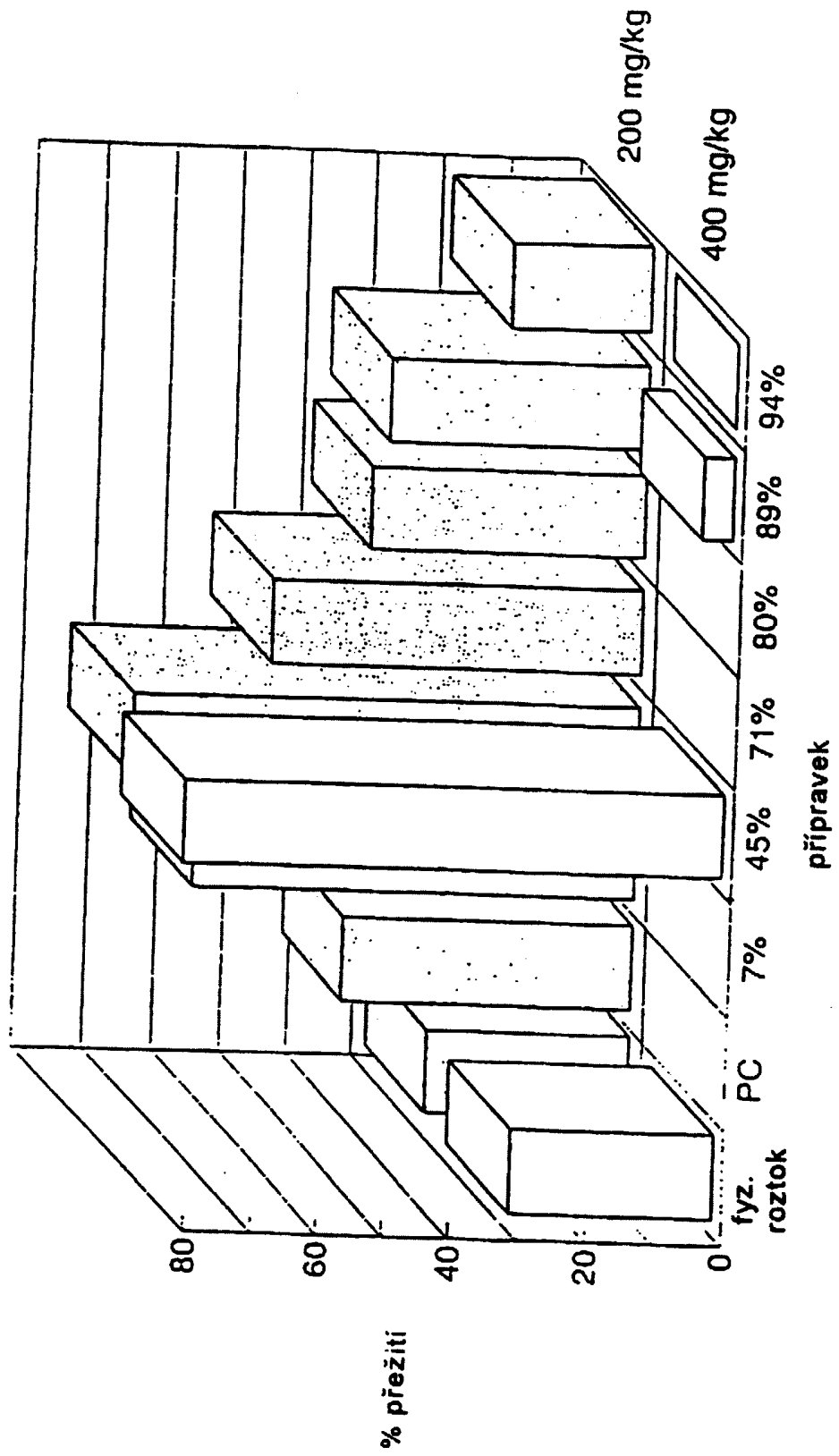
Obr. 1B



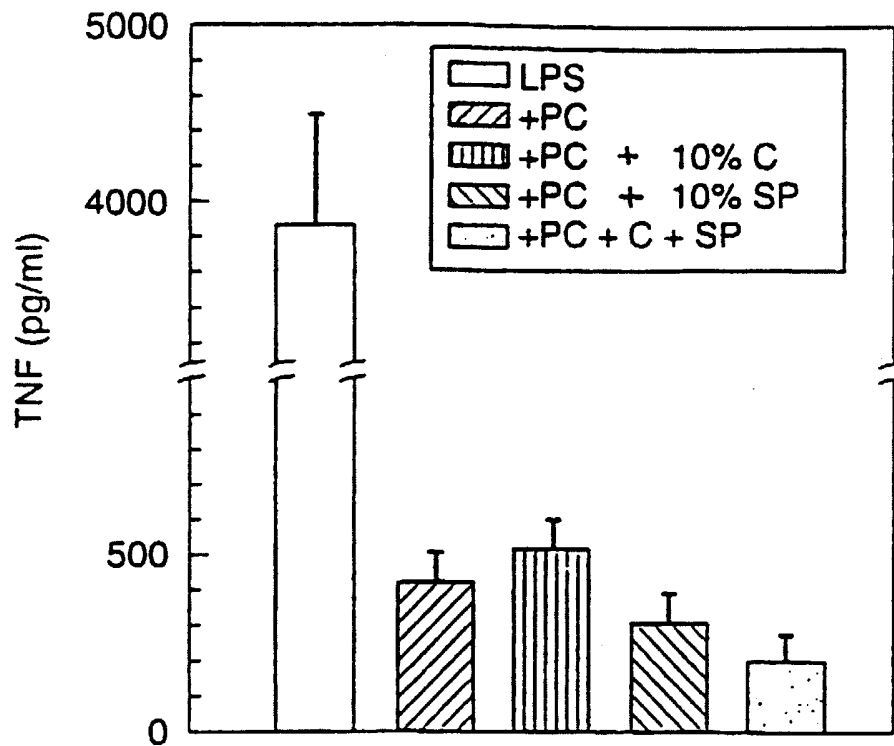
Obr. 2A



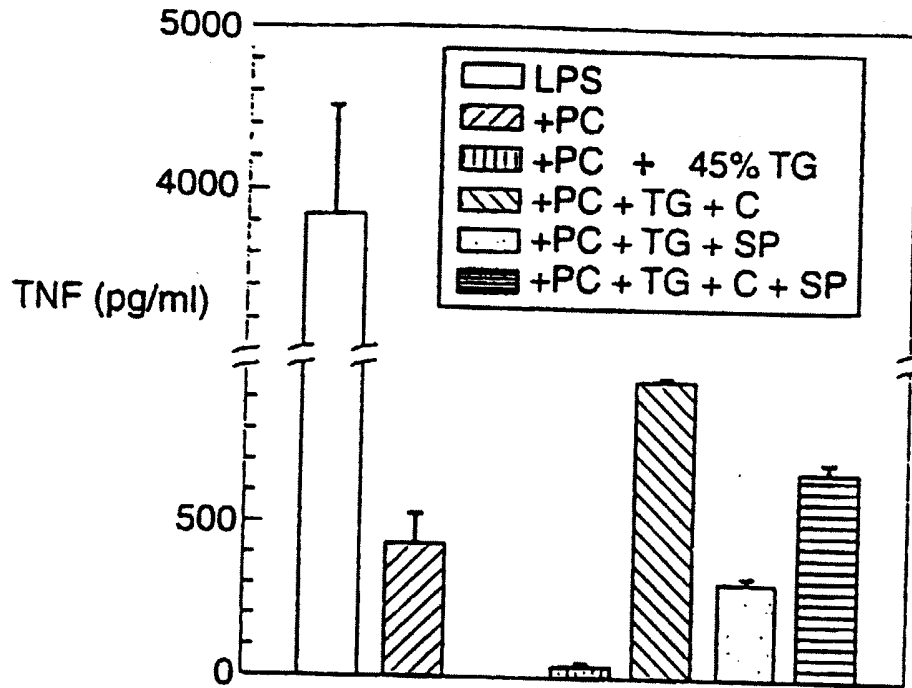
Obr. 3



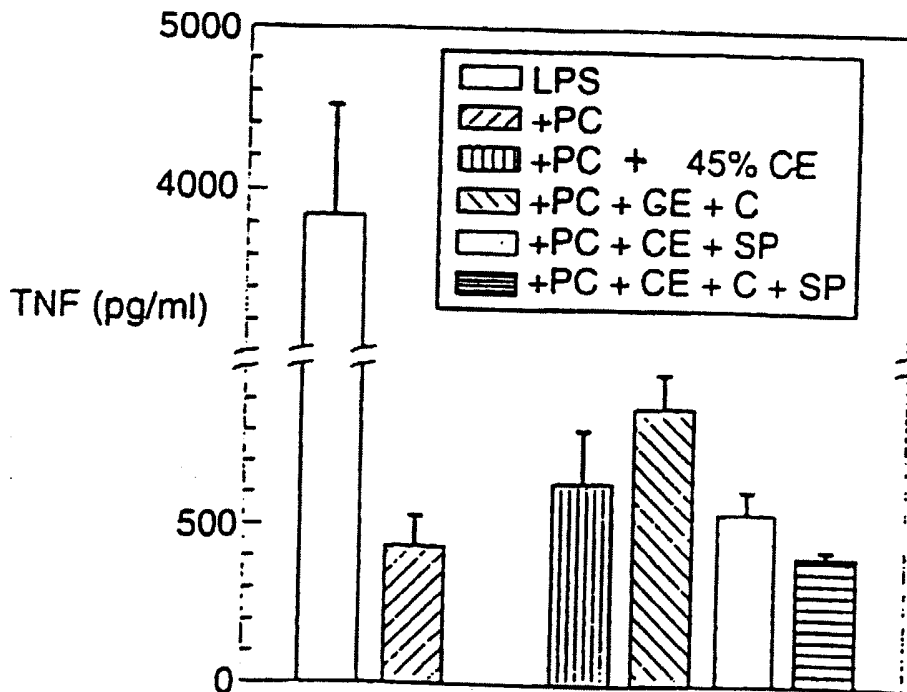
Obr. 4



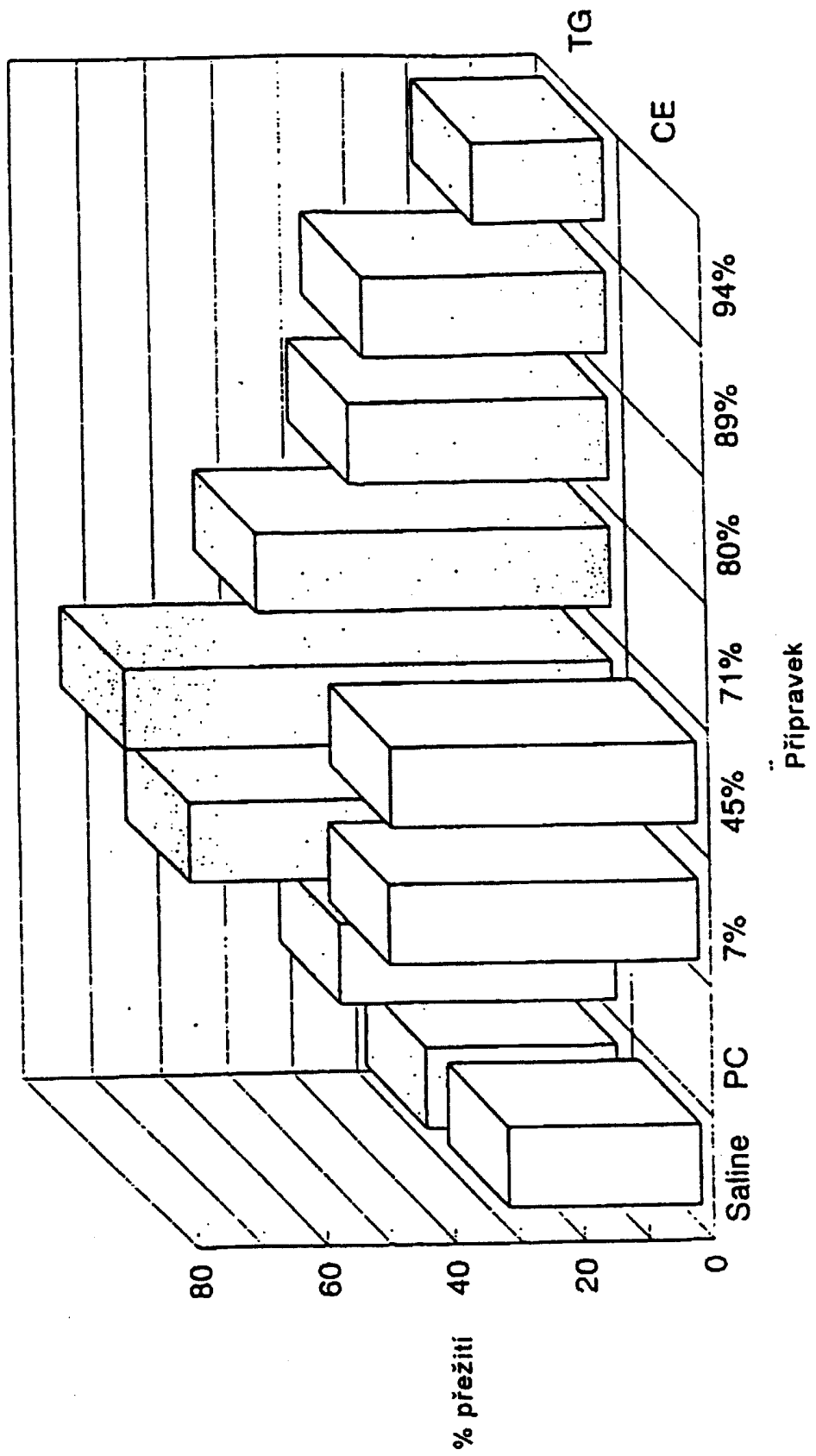
Obr. 5A



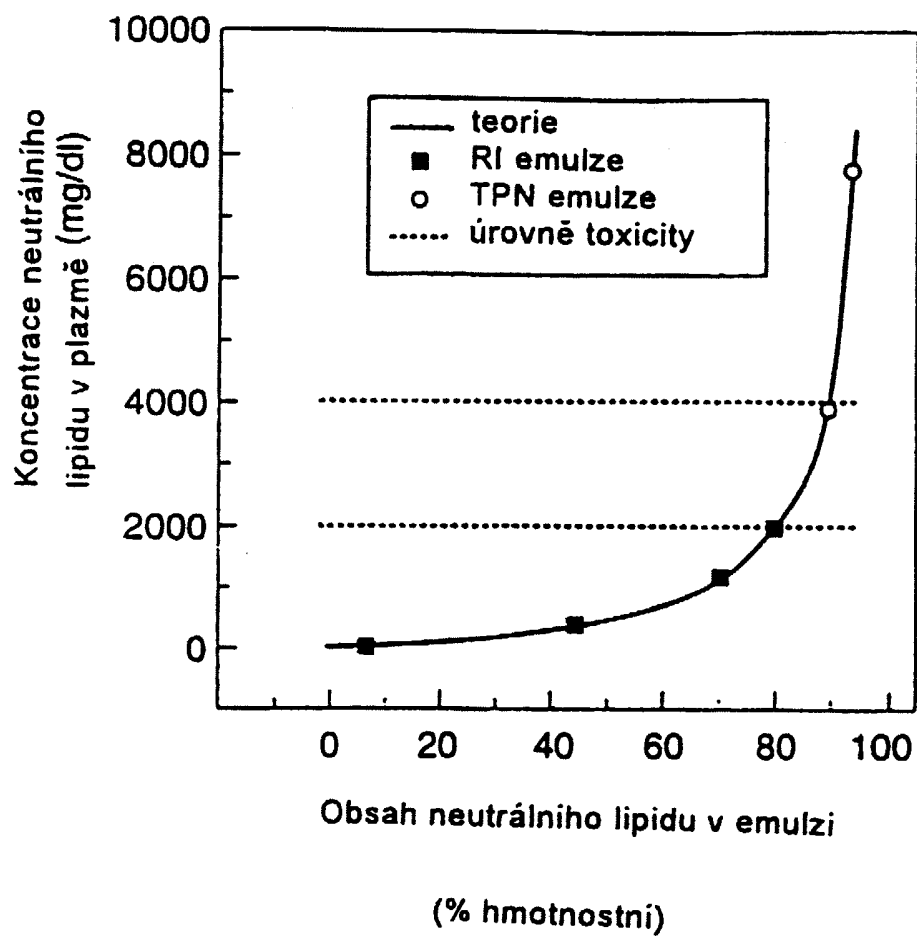
Obr. 5B



Obr. 6



Obr. 7



Konec dokumentu
