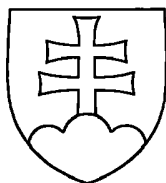


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **10. 4. 1998**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **08/840 777**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **16. 4. 1997**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 12. 2001**
Vestník ÚPV SR č.: **12/2001**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US98/07517**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO98/46237**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1425-99

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

A61K 31/70

- (71) Prihlasovateľ: **THE UNITED STATES OF AMERICA, represented by THE SECRETARY DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, Washington, DC, US;**
(72) Pôvodca: **Striker Gary E., Miami, FL, US;**
Striker Liliane J., Miami, FL, US;
(74) Zástupca: **Žovicová Viera, Mgr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Použitie pentózanu polysulfátu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli**

- (57) Anotácia:
Použitie pentózanu polysulfátu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie pacienta – cicavca trpiaceho chronickou progresívnou chorobou zjazvovania ciev, najmä artériosklerotickými chorobami, ako napríklad aterosklerózou, ktorá v postihnutej vaskulatúre spôsobuje zužovanie lúmenu a znižovanie rozťahovateľnosti. Celková denná dávka pentózan polysulfátu alebo soli pentózan polysulfátu sa pohybuje od 5 do 30 mg/kg telesnej hmotnosti pacienta, alebo 350 až 2 000 mg na deň u dospelých ľudských pacientov.

Použitie pentózanu polysulfátu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli

Oblasť techniky

Vynález sa týka použitia pentózanu polysulfátu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie chronických progresívnych chorôb zjazvovania ciev.

Doterajší stav techniky

Chronická progresívna choroba zjazvovania ciev (CPVSD - chronic progressive vascular scarring disease) je komplikácia niekoľkých z najbežnejších chorôb postihujúcich rozvinutý svet vrátane diabetes mellitus, hypertenzie, rôznych hyperlipidémii a podobne. Súčasné terapeutické spôsoby zaoberajúce sa CPVSD sú zamerané na základné príčiny. Žiaľ, vo väčšine neexistujú žiadne známe lieky, alebo je veľmi ťažké dosiahnuť ich kontrolu v širokej populácii. Okrem toho CPVSD je často nielen rozšírená, ale aj značne pokročilá, kým sa začne venovať lekárska pozornosť základnej príčine. Preto je potrebné pokúšať sa liečiť sekundárne komplikácie, z ktorých je CPVSD najvážnejšia, pretože vedie k zlyhaniu obličiek, mŕtvici, ochoreniam srdca a slepote.

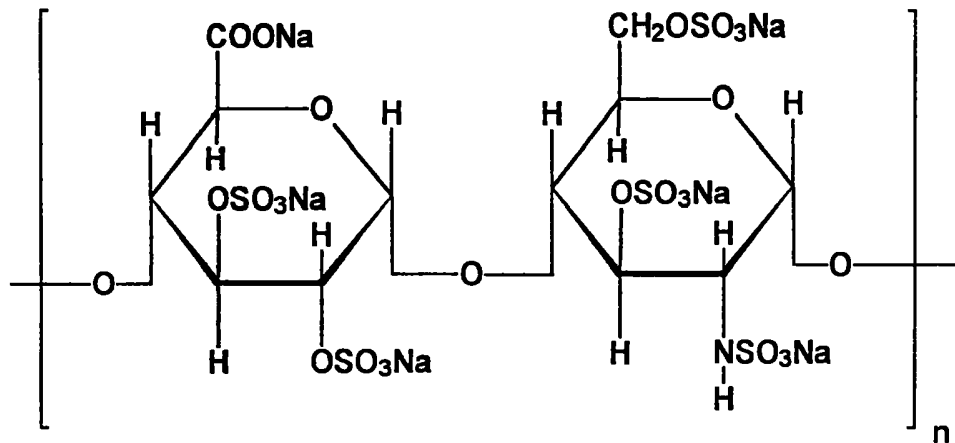
CPVSD je vo všeobecnosti charakterizovaná zmenou v bunkách hladkej svaloviny ciev. Jednou z dôležitých zmien je zvýšenie množstva a zmena typov väziva, ktoré syntetizujú. To má za následok zjazvovanie a výrazné zmeny vo funkcii. Toto vedie k strate elasticity ciev, čo má za následok cievy, ktoré sa nerozširujú a nesťahujú a ktoré majú zhrubnuté steny a zúžené lúmeny. Konečným dôsledkom je znížený prietok krvi alebo úplné upchatie. Medzi príklady na choroby zjazvovania ciev charakterizované týmito patofyziologickými procesmi patrí chronická progresívna glomerulárna choroba, napr. diabetom indukovaná glomerulaskleróza (zjazvovanie); progresívne zlyhanie obličiek po transplantácii obličiek; oklúzia bočných používajúcich na zabezpečenie vaskulárneho prístupu u pacientov v poslednom štádiu obličkovej choroby liečených hemodialýzou; iné chronické choroby malých ciev (ako napríklad u niektorých pacientov s hypertenziou); recidíva stenózy u pacientov, ktorí boli podrobení chirurgickému koronárnemu bypassu; a diabetická retinopatia.

Terapeutickým cieľom akejkoľvek liečby pre CPVSD musí byť znížiť už vytvorený nadbytok mimobunkového matrixu (zjazvenia), aby sa obnovila normálna priechodnosť a funkcia ciev, alebo prinajmenšom aby sa zabránilo ďalšiemu postupu choroby, alebo aby sa tento podstatne spomalil. Momentálne však neexistuje žiadna priama metóda zásahu do abnormalít v metabolizme tkaniva hladkej svaloviny alebo modulácie syntézy väziva, napriek ich dôležitosti pri chronickej progresívnej chorobe. Progresia týchto chorôb sa považuje za nevyhnutnú a nevratnú.

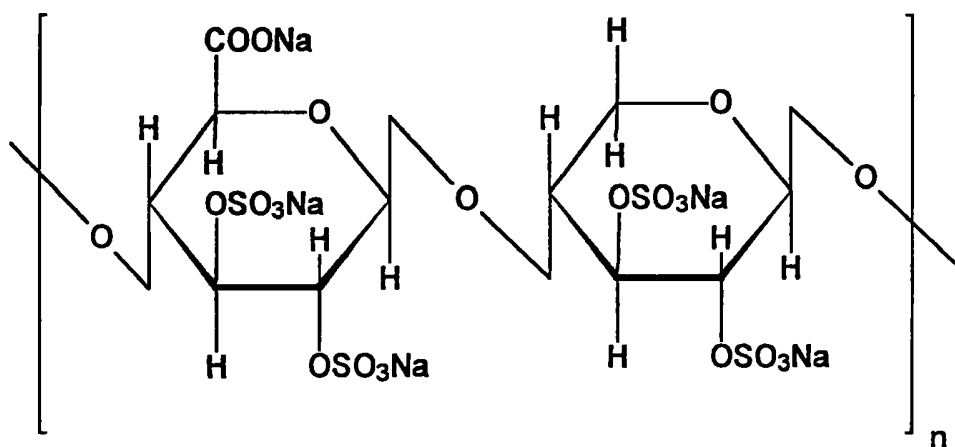
Je preto osobitne dôležité, aby sa vyvinul liečebný režim pre CPVSD, s výhodou pozostávajúci z orálneho podávania farmaceutického prostriedku nízkej toxicity, ktorý je účinný pri liečbe a obrátení CPVSD spôsobením regresie a degradácie už vzniknutých lézií.

Pentózan polysulfát (PPS) je vysoko sulfatovaný polosyntetický polysacharid s molekulovou hmotnosťou pohybujúcou sa od 1 500 do 6 000 Daltonov v závislosti od spôsobu izolácie. PPS môže byť v tej istej všeobecnej triede ako heparíny a heparinoidy, ale medzi PPS a heparínom je niekoľko rozdielov v chemickej štruktúre, metódach derivácie a fyzikálnochemických vlastnostiach. Zatiaľ čo heparín sa obyčajne izoluje z tkanív cicavcov, ako je napríklad hovädzia a bravčová svalovina, pečeň a črevá, PPS je polosyntetická zlúčenina, ktorej polysacharidová kostra (xylán) sa extrahuje z kôry buka alebo z iných rastlinných zdrojov a potom sa spracúva sulfatačnými činidlami ako kyselina chlórsulfónová alebo trichlorid sulfurylu a kyselina. Po sulfatácii sa na PPS obyčajne pôsobí hydroxidom sodným, čím sa získa sodná soľ.

Ako ilustrujú nasledujúce vzorce,



HEPARÍN



PENTÓZAN POLYSULFÁT

heparín je sulfátovaný polymér opakujúcich sa dvojitéch cukrových monomérov, (D)-glukózamínu a (D)-glukurónovej kyseliny (obe látky sú 6-uhlíkové hexóзовé cukry), s aminosou funkčnou skupinou na glukózamíne; PPS je sulfátovaný lineárny polymér opakujúcich sa jednoduchých monomérov (D)-xylózy, 5-uhlíkového pentóзовého cukru vo svojej forme pyranóзовého kruhu. Zatiaľ čo heparín otáča rovinu polarizovaného svetla doprava, PPS ho otáča doľava.

Čo sa týka biologických vlastností, PPS predlžuje čiastočný tromboplastínový čas a používal sa na prevenciu venózneho trombózy, ale má iba jednu pätnástinu antikoagulačnej potencie heparínu (vo všeobecnosti pozrite Wardle, *J. Int. Med. Res.*, 20, 361-370, 1992). PPS bol tiež uvádzaný ako užitočný pri liečbe infekcií močových ciest a intersticiálnej cystitíde (patent USA č. 5,180,715) a v kombinácii s angiostatickým steroidom pri zástave angiogenézy a kapilárnom, bunkovom alebo membránovom presakovaní (patent USA č. 4,820,693).

Niektorí výskumníci ukázali, že PPS inhibuje proliferáciu buniek hladkej svaloviny a znižuje hyperlipidémiu, a na tejto báze navrhli, že PPS by mohol byť užitočný profylakticky pri obmedzovaní tvorby aterosklerotického plaku, inhibícií proliferácie mezangiálnych buniek a zabraňovaní tvorbe kolagénu a glomeruloskleróze (Paul a kol., *Thromb. Res.*, 46, 793-801, 1987; Wardle, *ibid.*). Nikto sa však predtým nesústredil na aspekty zjazvovania CPVSD (namiesto inhibície proliferácie buniek) ako napríklad aterosklerózu a nikto nedemonštroval, že by bolo vhodné zastaviť a/alebo obrátiť zjazvovanie ciev, t.j. PPS nebol v tomto kontexte zvažovaný. Okrem toho žiadne z návrhov možnej užitočnosti PPS pri chorobách zjazvovania podľa doterajšieho stavu techniky neboli podporené žiadnymi vedeckými údajmi o účinnosti generovanými u intaktných zvierat, ale boli založené na *in vitro* štúdiách zvieracieho tkaniva, ktoré často nie sú prediktívne pre účinnosť *in vivo*.

Hoci nedávno sa objavili správy o užitočnosti PPS pri inhibícii fibrózy a vzniku jaziev (pozrite napr. Roufa a kol., patent USA č. 5,605,938), tieto práce sa zaoberajú potlačením invázie fibroblastov v koži a súvisiacich oblastiach tkanív, ale nie chorobami zjazvovania buniek hladkej svaloviny, ktoré sú veľmi odlišné v etiológii a patológii.

Podstata vynálezu

Vynález sa týka použitia pentózanu polysulfátu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie pacienta - cicavca trpiaceho chronickou progresívnou chorobou zjazvovania ciev, ktorá v postihnutej vaskulatúre spôsobuje zužovanie lúmenu a znižovanie rozťahovateľnosti. Predmetné použitie poskytuje liečbu CPVSD nielen na zastavenie chorobného procesu, ale na skutočné obrátenie tohto procesu a spôsobenie regresie existujúceho zjazvenia alebo lézií. Ďalším cieľom vynálezu je použitie komerčne dostupnej farmaceutickej kompozície, ktorú možno podávať konvenčnými spôsobmi, ktorá je netoxická a nebude pravdepodobne vyvolávať závažné vedľajšie účinky a ktorá je vysoko účinná pri liečbe CPVSD.

Vzhľadom na uvedené a ďalšie ciele, ktoré budú zrejmé ďalej, predmetom vynálezu je, stručne povedané, použitie pentózanu polysulfátu alebo jeho

farmaceuticky prijateľnej soli na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie pacienta - cicavca trpiaceho CPVSD, ktorým sa zastaví progres choroby a spôsobí sa rozklad alebo zmenšenie už vytvoreného zjazvenia alebo fibrotických lézií v postihnutom orgáne alebo vaskulatúre, pričom použitie spočíva v tom, že sa pacientovi podá farmaceutická kompozícia obsahujúca pentózan polysulfát alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ v množstve účinnom na liečbu choroby zjazvenia ciev. Uprednostňovanou formou podania PPS je orálna forma, napr. vo forme tabliet, kapsúl alebo kvapalín.

Podrobný opis vynálezu

Predložený vynález sa týka použitia pentózanu polysulfátu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie pacienta - cicavca trpiaceho chronickou progresívnou chorobou zjazvovania ciev (CPVSD) v postihnutej vaskulatúre, najmä v artériách ako aorta, pričom má zastaviť alebo podstatne spomaliť progres choroby a spôsobiť vstrebanie a/alebo zmenšenie už vytvorených jazvových lézií. Pacientovi sa podá farmaceutická kompozícia obsahujúca pentózan polysulfát (PPS) alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ v množstve účinnom na liečbu choroby zjazvenia ciev.

Choroby, ktoré možno liečiť použitím podľa vynálezu, okrem iných zahŕňajú chronickú progresívnu glomerulárnu chorobu, vrátane diabetom indukovanej glomerulosklerózy zjazvovacieho typu; arteriálne zjazvenie v dôsledku artériosklerózy vrátane aterosklerózy; progresívne zlyhanie obličiek v dôsledku intersticiálneho zjazvenia po transplantácii obličiek; oklúziu bočných zjazvením používaných na zabezpečenie vaskulárneho prístupu u pacientov v poslednom štádiu obličkovej choroby liečených hemodialýzou; iné chronické choroby zjazvovania malých ciev (ako napríklad u niektorých pacientov s hypertenziou); recidívu stenózy v dôsledku zjazvenia u pacientov, ktorí boli podrobení chirurgickému zákroku koronárneho bypassu; a diabetickú retinopatiu.

Osobitne dôležité vzhľadom na prevalenciu a pernicióznou povahu tejto choroby je liečenie pre chronické artériosklerotické zjazvovacie patológie s cieľom obrátiť alebo zastaviť progres choroby a vstrebať existujúce vaskulárne zjazvenia a lézie. Napríklad podanie PPS podľa vynálezu môže zastaviť a obrátiť progres aterosklerózy veľkých ciev, pričom spôsobuje vstrebanie a/alebo zmenšenie už

vytvoreného zjazvenia arteriálnych stien postihnutých aterosklerotickým plakom a podstatné zväčšenie intimálnej prierezovej plochy umožňujúc väčší prietok krvi cez vaskulárny lúmen.

Fráza "množstvo účinné na liečbu choroby zjazvenia ciev" tak, ako sa používa tu, znamená množstvo PPS alebo jeho soli vo farmaceutickej kompozícii, ktoré je účinné pri podaní raz alebo viackrát denne počas predpísaného obdobia pri zastavovaní a obrátení progresívnych symptómov CPVSD. U ľudských pacientov je účinná celková denná dávka 5 až 30 mg/kg telesnej hmotnosti pacienta, alebo 350 až 2 000 mg na deň u dospelých pacientov a výhodne 500 až 1 500 mg PPS alebo soli PPS, pričom uvedené dávky sa podávajú v jednej alebo štyroch rovnomerných dávkach, na dosiahnutie terapeutického cieľa liečenia a obrátenia CPVSD. U menších cicavcov možno interval dávok upraviť nadol podľa telesnej hmotnosti, druhu a povahy choroby.

Použitie podľa vynálezu spočíva ďalej v tom, že farmaceutická kompozícia obsahuje účinné množstvo PPS a aspoň jednu farmaceuticky prijateľnú inertnú zložku. Kompozícia môže byť v akejkolvek štandardnej farmaceutickej liekovej forme, ale výhodne je v liekovej forme na orálne podávanie.

Medzi liekové formy na orálne podanie môžu patriť konvenčné tablety, potáhané tablety, kapsule alebo kaplety, pastilky, kvapaliny, elixíry alebo akékoľvek iné orálne liekové formy známe vo farmácii.

Ako farmaceuticky prijateľné inertné zložky možno použiť plnivá, spojivá, rozpúšťadlá atď., ktoré nezasahujú do liečebnej aktivity PPS voči CPVSD. Ak treba upraviť veľkosť liekovej formy, možno použiť aj plnivá ako hlinky alebo kremeliny.

Na dosiahnutie požadovaných fyzikálnych vlastností liekovej formy môžu byť potrebné ďalšie zložky, napríklad vehikulá a nosiče. Takými fyzikálnymi vlastnosťami sú napríklad rýchlosť uvoľňovania, štruktúra a veľkosť. Medzi príklady na vehikulá a nosiče užitočné pri orálnych liekových formách patria vosky ako napríklad včelí vosk, bobří vosk, glykovosk a karnaubový vosk, celulózoové zlúčeniny ako napríklad metylcelulóza, etylcelulóza, karboxymetylcelulóza, celulózo-acetát ftalát, hydroxypropylcelulóza a hydroxypropylmetylcelulóza,

polyvinylchlorid, polyvinylpyrolidón, stearylalkohol, glycerín monostearát, metakrylátové zlúčeniny ako napríklad polymetakrylát, metylmetakrylát a etylénglykoldimetakrylát, polyetylénglykol a hydrofilné gummy.

V kompozíciách podľa predloženého vynálezu je účinná zložka PPS výhodne prítomná v množstve medzi 50 a 300 mg na liekovú formu. Presné dávkovanie podávané každému pacientovi bude funkciou stavu, ktorý sa lieči, a fyzických charakteristík pacienta, ako je napríklad vek a telesná hmotnosť.

Aktívnou farmaceutickou zložkou môže byť PPS alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ, napr. sodná soľ. Jednou z výhodných orálnych liekových foriem na použitie v spôsobe podľa vynálezu sú želatínové kapsule Elmiron® (Baker Norton Pharmaceuticals, Inc., Miami, Florida), ktoré obsahujú 100 mg PPS sodného a ako vehikulá mikrokryštalickú celulózu a stearan horečnatý.

Hoci lieková forma na orálne podávanie sa uprednostňuje, vynález zahŕňa aj podanie PPS alebo jeho solí parenterálnou, transdermálnou, transmukozálnou alebo akoukoľvek inou cestou podania známou a konvenčne využívanou v oblasti medicíny a farmácie. Rovnako kompozície podľa vynálezu môžu zahŕňať PPS vo farmaceuticky prijateľných parenterálnych, transdermálnych, transmukozálnych alebo iných konvenčných vehikulách a liekových formách. Mnoho príkladov na také farmaceuticky prijateľné vehikulá možno nájsť v *Remington's Pharmaceutical Sciences* (17. vydanie (1985)) a v iných štandardných textoch. Bez ohľadu na použitú cestu podávania alebo typ farmaceutickej liekovej formy je interval dávkovania pre účinnú zložku PPS od 5 do 30 mg/kg telesnej hmotnosti pacienta alebo 350 až 2 000 mg a výhodne 500 až 1 500 mg, hoci dávky smerom k dolnej hranici tohto intervalu by sa pravdepodobne použili pri parenterálnom podaní.

Farmaceutické kompozície môžu zahŕňať aj účinné zložky iné ako PPS alebo soľ PPS, napríklad iné kompozície, ktoré môžu byť užitočné pri manažmente CPVSD.

Použitie podľa vynálezu umožňuje pohodlnú, bezpečnú a účinnú liečbu pacientov trpiacich rôznymi formami CPVSD, ktoré môžu často ohrozovať život alebo orgán. Použitá farmaceutická kompozícia, o ktorej je dokázané, že má nízku toxicitu a nízku incidenciu vedľajších účinkov, má vplyv nielen na zastavenie toho,

čo sa dlho považovalo za nevyhnutný progres chronickej choroby zjazvovania ciev, ale na skutočné zastavenie a/alebo obrátenie už vytvorených jazvových lézií, aby sa obnovila normálna priechodnosť a funkcia ciev.

Nasledujúce príklady zahŕňajú (a) popisy experimentov už publikovaných v lekárskej literatúre, ktoré overujú použitie istých techník PCR (polymerase chain reaction - polymerázovej reťazovej reakcie) na kvantifikáciu mRNA kolagénu jazvového typu a súvisiacich faktorov v glomerulách a ktoré dokazujú, že relatívne glomerulárne bunkové počty nekorelujú s hladinami produkcie kolagénu jazvového typu; (b) experimenty vykonané vynálezcom alebo pod jeho dohľadom, ktoré demonštrujú *in vitro* a *in vivo* účinnosť PPS v regulácii produkcie kolagénu jazvového typu a bunkových rastových faktorov smerom nadol a regulácii aktivity kolagenázy na degradáciu existujúcich nánosov jazvového kolagénu smerom nahor; a (c) experimenty vykonané vynálezcom alebo vykonané pod jeho dohľadom, ktoré demonštrujú *in vivo* účinnosť PPS v obrátení aterosklerózy vrátane podstatného zníženia množstva a distribúcie aterosklerotických plakov v postihnutých cievach. Tieto príklady však nemajú za cieľ stanovovať materiály, techniky alebo liekové formy, ktoré sa musia používať pri uplatňovaní predloženého vynálezu, alebo ktoré by akýmkoľvek spôsobom obmedzovali rozsah vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 predstavuje kvantifikáciu mRNA $\alpha_1\text{IV}$ kolagénu kompetitívnou PCR na jednej desatine glomerulu z normálnej päť týždňov starej myši (ako je opísané v príklade 1 ďalej), pričom sa na ňom nachádza nasledujúce:

a) v hornej časti je reakčná schéma a príslušný gél vyfarbený etidium bromidom po PCR amplifikácii; a

b) v dolnej časti je graf pomeru mutantnej cDNA kolagénu na glomerulu proti množstvu mutantnej cDNA zavedenej do každej z deviatich skúmaviek obsahujúcich všetky PCR reagenty.

Obrázok 2 zobrazuje:

a) v hornej časti rezy obličky vyfarbené pomocou PAS z dvoch nefrektomických vzoriek s renálnym karcinómom (A - normálna glomerulárna histológia, B - výrazná skleróza);

b) v strednej časti (C - D) imunofluorescenčnú mikroskopiu, protilátka na kolagén typu IV v tých istých obličkách; a

c) v dolnej časti (E) stĺpcový graf vyjadrujúci index sklerózy v tých istých obličkách; cDNA α_2 IV kolagénu bola určená kvantifikáciou kompetitívnou PCR v súboroch 50 mikrodisektovaných glomerúl (hodnoty sú: 145 ± 22 oproti $1046 \pm 74 \times 10^{-4}$ attomólov/glomerula).

Obrázok 3 je stĺpcový graf vyjadrujúci index sklerózy v obličkách piatich ľudských pacientov bez glomerulárnej sklerózy v porovnaní s piatimi pacientmi so sklerózou, vyjadrený v glomerulárnych relatívnych bunkových počtoch a hladinách cDNA α_2 IV kolagénu.

Obrázok 4 je stĺpcový graf vyjadrujúci pomery mRNA kolagénu α_2/α_3 IV z ľudských pacientov s membranóznou glomerulonefritídou (MN) a diabetickou nefropatiou (DM) a z nefrektómií s glomerulosklerózou (NX GS) a bez glomerulosklerózy (NX NI).

Obrázok 5 je stĺpcový graf vyjadrujúci účinok PPS sodného na syntézu DNA v normálnych mezangiálnych bunkách podľa určenia zabudovaním tríciovaneho tymidínu (24 hodín inkubácie) a vynesení ako počty tríciovaneých za minútu na 10^3 buniek oproti koncentrácii PPS sodného v $\mu\text{g/ml}$.

Obrázok 6 je stĺpcový graf odrážajúci účinok PPS sodného na rast buniek u normálnych mezangiálnych buniek s vynesení počtu buniek po troch dňoch inkubácie oproti pridanej koncentrácii PPS sodného v $\mu\text{g/ml}$.

Obrázok 7 je stĺpcový graf vyjadrujúci porovnanie účinkov PPS sodného a heparínu (s neliečenou kontrolnou skupinou) na rast buniek u normálnych mezangiálnych buniek po troch a piatich dňoch inkubácie.

Obrázok 8 je graf vyjadrujúci proliferáciu normálnych mezangiálnych buniek v priebehu času u buniek inkubovaných so sérom a PPS sodným v porovnaní s kontrolou pozostávajúcou z buniek inkubovaných iba sérom.

Obrázok 9 je graf hodnôt mRNA z vrstiev normálnych mezangiálnych buniek vystavených pôsobeniu PPS sodného (100 $\mu\text{g/ml}$) rôzne dlhý čas a reverzne transkribovaných odrážajúci zvýšenie, zníženie alebo žiadnu zmenu v hladinách mRNA kolagénov $\alpha_1\text{IV}$ a $\alpha_1\text{I}$, mRNA kolagenáz (metaloproteináz) 72 kDa a 92 kDa, mRNA rastového faktoru TGF- β a mRNA β -aktínu bunkového proteínu.

Obrázok 10 je stĺpcový graf vyjadrujúci pomer kolagénu $\alpha_1\text{IV}$ ku GAPDH podľa určenia kompetitívnou PCR na základe glomerúl z GH transgénnych myší, ktorým sa podával PPS sodný v pitnej vode počas 10 - 12 týždňov a glomerúl z kontrolných GH myší, ktorým sa podávala obyčajná voda.

Obrázok 11 sú fotografie prierezov brušných aort eutanizovaného králika Watanabe z neliečenej kontrolnej skupiny a ďalšieho králika Watanabe zo skupiny liečenej subkutánnym PPS sodným (Elmiron®).

Obrázok 12 je stĺpcový graf vyjadrujúci prierezové plochy intimy rôznych vetiev aort králikov Watanabe, ktorým sa podávala iba diéta s vysokým cholesterolom a intimálne plochy porovnateľných prierezov odobratých z ďalšej skupiny králikov Watanabe, ktorým sa podávala diéta s vysokým cholesterolom a PPS sodný v pitnej vode.

Obrázok 13 je stĺpcový graf vyjadrujúci pomery intimálnych a mediálnych prierezových plôch rôznych vetiev aort králikov Watanabe, ktorým sa podávala len diéta s vysokým cholesterolom, a porovnateľné pomery namerané v rezoch odobratých od inej skupiny králikov Watanabe, ktorým sa podávala diéta s vysokým cholesterolom a PPS sodným v pitnej vode.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Kvantifikácia kolagénu

Ako je opísané v práci Peten a kol., *Am. J. Physiol.*, 32, F951-957 (1992), kolagén $\alpha_1\text{IV}$ a $\alpha_2\text{IV}$ v myšacích glomerulách možno kvantifikovať nasledujúcou metódou: množstvo cDNA predstavujúce mRNA v jednej desatine glomeruly z normálnej päť týždňov starej myši a štandardné množstvo $\alpha_1\text{IV}$ a $\alpha_2\text{IV}$ kolagénových primérov sa pridalo do každej z niekoľkých skúmaviek obsahujúcich

všetky reagenty PCR zo súpravy GeneAmp DNA Amplification Kit (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut). Do tejto zmesi sa pred amplifikáciou pridali sériové zriedenia mutovanej cDNA obsahujúcej buď nové reštrikčné miesto na štiepenie enzýmom alebo deléciu (schéma uvedená na obrázku 1 v hornej časti). Koncentrácie mutantu sa určili v predchádzajúcom experimente určenom na zistenie bodu ekvivalencie ($y = 1$).

Po amplifikácii pomocou PCR sa celá reakčná zmes zaviedla priamo na 4 % agarózový gél Nusieve : Seakem (3 : 1) (FMC Bioproducts, Rockland, ME) v gélovom prístroji H5 Horizon (Life Technologies) a podrobila sa elektroforéze. Pásky DNA sa zviditeľnili vyfarbením etidium bromidom a osvetlením ultrafialovým svetlom (UV). Fotografie sa zhotovili s 55 pozitívnymi/negatívnymi filmami Polaroid (Polaroid, Cambridge, MA) (pozrite obrázok 1, strednú časť). Gélové negatívy sa zosnímali jednorozmernou laserovou denzitometriou na analýzu kompetitívnej PCR (Shimadzu; Scientific Instruments, Columbia, MD).

Vypočítali sa denzitometrické hodnoty skúšobných a mutantných pásov a ich pomer pre každú reakčnú skúmavku bol vynesý ako funkcia množstva pridanej mutantnej šablóny (obrázok 1, dolná časť). Pre mutant kolagénu α_2IV sa nameraný denzitometrický pás pred zhotovením závislosti mutantných a skúšobných pásov korigoval faktorom 562/479. Pre pásky mutantu α_2IV sa ich denzitometrické hodnoty sčítali pred delením hodnotou pásu divého (skúšobného) typu. Lineárnou regresnou analýzou sa získala priamka. Množstvo cDNA v skúšobnej vzorke sa vypočítalo ako množstvo, pri ktorom pomer hustoty mutantného a skúšobného pásu bol 1. Kompetitívne skúšky PCR sa uskutočnili dvakrát alebo trikrát.

Príklad 2

Zmeny v sklerotických glomerulách

Ako je opísané v práci Peten a kol., *J. Exp. Med.*, **176**, 1571 - 1576 (1992), z ľudských pacientov sa získali unilaterálne nefrektomické vzorky s karcinómom obličky. Pacienti nemali žiadnu anamnézu diabetes, hypertenzie alebo iných systémových chorôb spojených s glomerulárnou chorobou. Vzorky kortikálneho tkaniva vzdialeného od zrejmých nádorov boli dané do Carnoyho fixatíva, obalili sa

mezangiálneho matrixu sa vyhodnotila nezávisle histologickým vyšetrením materiálu vyfarbeného pomocou PAS (obrázok 2, horná časť) a imunofluorescenčnou mikroskopiou zmrazených rezov po vystavení pôsobeniu protilátky na kolagén typu IV (PHM-12, Silenus, Westbury, NY) (obr. 2, stredná časť).

Skúška kompetitívnou PCR sa uskutočnila podľa príkladu 1, čím sa kvantifikovalo množstvo kolagénu α_2 IV (jazvového typu) mimobunkového matrixu. Určili sa relatívne koncentrácie kolagénu tohto typu v glomerulách, ktoré sa predtým zistili ako normálne alebo sklerotické, ako je uvedené v dolnej časti obrázka 2.

Relatívne počty buniek v glomerulách piatich pacientov bez glomerulárnej sklerózy (normálne) sa porovnali s piatimi pacientmi so sklerózou. Ako je uvedené na obrázku 3, rozdiel medzi skupinami v glomerulárnom relatívnom počte buniek nebol významný ($p > 0,8$), zatiaľ čo pre hladiny cDNA kolagénu α_2 IV bol rozdiel štatisticky významný ($0,01 < p < 0,025$).

Príklad 3

Relatívne pomery kolagénovej mRNA v glomerulách z normálnych a chorých obličiek

Pomocou metodiky opísanej v príkladoch 1 a 2 boli relatívne pomery mRNA kolagénu α_2/α_3 IV kvantifikované v glomerulách odobraných z diagnostických biopsií ľudských pacientov s membranóznou glomerulonefritídou (MN) a diabetickou nefropatiou (DM) a z nefrektómií s glomerulosklerózou (NX GS) a bez glomerulosklerózy (NX NI). Ako je uvedené na obrázku 4, pomery mRNA kolagénu α_2/α_3 IV boli signifikantne vyššie v DM a v NS GS ako v NX NI. (** $P = 0,0002$, * $P = 0,02$).

Príklad 4

In vitro štúdie s PPS

Štúdia A

Štruktúra pokusu:

Normálne mezangiálne bunky (8) sa naplatničkovali do bazálneho média plus 20 % fetálneho hovädzieho séra (Gibco, Grand Island, NY) v 24-jamkových platničkách (Nunc, PGC Scientific Corp., Gaithersburg, MD) pri hustote $2 - 2,5 \times 10^4$ buniek na jamku. Po 24 hodinách sa médium zlikvidovalo, bunky sa premyli dvakrát PBS a inkubovali sa 24 - 72 hodín v bezsérovom médiu s 0,1 % hovädzím sérovým albumínom (RIA grade, Sicjma). Médium sa nahradilo čerstvým bazálnym médiom plus 20 % fetálnym hovädzím sérom s 5 - 100 $\mu\text{g/ml}$ PPS alebo bez neho, alebo sa uskutočnilo porovnanie so štandardným heparínom (100 $\mu\text{g/ml}$). Bunky duplicitných jamiek sa trypsinovali a spočítali v počítací buniek Elzone[®] (Particle Data Inc., Elmhurst, IL) v dňoch +3 a +5. V paralelných jamkách sa určilo zabudovanie tymidínu pridaním 1 $\mu\text{Ci/jamka}$ [^3H] tymidínu ([metyl- ^3H] tymidínu); 2,0 Ci/mM; DuPont NEN, Boston, MA). Počty sa určili v deň 1 alebo v deň 3.

Výsledky:

V deň jeden (24 hodín) maximálna odozva na dávku dosiahla plató pri 50 $\mu\text{g/ml}$ (obrázok 5), zatiaľ čo v deň tri sa maximálna inhibičná odozva zaznamenala pri 25 $\mu\text{g/ml}$ (obrázok 6).

Porovnanie medzi žiadnym prídavkom (kontrola), heparínom a PPS (100 $\mu\text{g/ml}$) odhaľuje, že na molárnej báze je PPS zhruba dvakrát potentnejší ako natívny heparín (obrázok 7). Odozvy sú celkom reprodukovateľné (chybové stĺpce sú veľmi tesné).

Sumárny graf (obrázok 8) porovnáva účinok PPS pridaného do séra na kontrolu buniek, ktoré boli vystavené iba séru.

Štúdia B

Vrstvy normálnych mezangiálnych buniek sa vystavili pôsobeniu PPS (100 µg/ml) počas rôzne dlhých období a reverzne sa transkribovali, hladiny mRNA sa zmerali pre vybrané molekuly v deň 1 a porovnali sa s hladinami v deň 3 a 5 (pozrite obrázok 9). V mRNA kolagénu typu IV sa nepozorovali žiadne zmeny, mRNA kolagénu typu I sa podstatne znížila, mRNA TGF-β sa znížila o 50 % a aktivita enzýmu 92 kDa sa zvýšila o viac ako 50 %. Kontrolou bol β-aktín, ktorý bol nezmenený, čo je konzistentné s neprítomnosťou proliferácie v ošetrovaných bunkách.

Príklad 5

Štúdie s GH transgénnyimi myšami

Štruktúra experimentu:

Dvanásť 6 týždňov starých GH transgénnych myší bolo identifikovaných PCR analýzou detergentom extrahovaného materiálu z chvostových biopsií pomocou špecifických primérov pre cDNA hovädzieho rastového hormónu, ktorý nereagoval krížovo s GH sekvenciou myši. Šiestim GH myšiam sa 10 - 12 týždňov orálne podával PPS sodný (Elmiron®, Baker Norton Pharmaceuticals, Inc.) v pitnej vode a šesť rovnako starých GH myší dostávalo rovnako dlho vodu z vodovodu. Množstvo PPS sodného v pitnej vode bolo 100 mg/kg telesnej hmotnosti zvieraťa.

Izolácia glomerúl a in situ reverzná transkripcia:

Glomeruly sa izolovali mikrodisekciou za prítomnosti inhibítorov RNázy. Ľavá oblička sa premývala fyziologickým roztokom a potom kolagenázovým roztokom obsahujúcim rozpustné inhibítory RNázy. Dolný pól sa odstránil pred premývaním kolagenázou a okamžite sa zmrazil na suchom ľade na zymografiu. Po naštípení kolagenázou sa 40 až 60 glomerúl izolovalo pri 4 °C za prítomnosti vanadytribonukleozidového komplexu na reverznú transkripciu (RT). In situ RT sa uskutočnila rovnako, ako je uvedené vyššie, s výnimkou toho, že glomeruly sa raz zmrazili a roztopili v zmesi acetónu a suchého ľadu a pôsobilo sa na ne ultrazvukom pri 2 °C 5 minút za prítomnosti 2 % Tritonu a 4 jednotiek/µl ľudského

ultrazvukom pri 2 °C 5 minút za prítomnosti 2 % Tritonu a 4 jednotiek/ μ l ľudského placentárneho RNázového inhibítora (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) pred pridaním komponentov RT. Na chladenie vzoriek počas ozvučovania ultrazvukom sa použil Micro Ultrasonic Cell Disrupter (Kontes, Vineland, NJ).

Štandardné a kompetitívne PCR skúšky:

Priméry pre myšací kolagén α_1 IV a α_1 I, α aktín buniek hladkej svaloviny, β -aktín, laminín B1, tenascín, mRNA 92 kDa metaloproteinázy a 72 kDa metaloproteinázy, a pre genomickú DNA hovädzieho rastového hormónu sa syntetizovali na PCR-Mate (Applied Biosystems, Foster City, CA). Totožnosť každého amplifikovaného produktu sa overila podľa veľkosti a analýzou reštrikčnými enzýmami. Špecifickosť priméru pre mRNA sa určila vynechaním enzýmu reverzná transkriptáza. PCR sa uskutočnila pomocou súpravy GeneAmp DNA Amplification Kit (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT). cDNA odvodená zo súboru 40 - 60 glomerúl na myš sa najprv analyzovala štandardnou PCR pomocou logaritmickej lineárnej časti PCR amplifikácie. Toto umožnilo rýchle nekvantitatívne vyhodnotenie hladín mRNA. Potom sa použili skúšky kompetitívnou PCR na zmeranie kolagénu α_1 IV (a aby sa normalizovali údaje medzi zvieratami, vypočítal sa pomer cDNA kolagénu α_1 IV k enzýmu GAPDH), PDGF-B, α aktínu buniek hladkej svaloviny, β -aktínu a laminínu B1 skonštruovaním mutantu cDNA pre každú molekulu s malou internou deléciou alebo novým reštrikčným enzýmovým miestom. Analýza produktov PCR sa uskutočnila pomocou denzitometra PDI, v ktorom bol softvér analýzy obrazov Quantity One®. Analýzy kompetitívnou PCR sa uskutočnili dvakrát alebo trikrát.

Výsledky:

Ako vidno z obrázka 10, stredný pomer kolagénu typu IV ku GAPDH bol menší ako polovičný v skupine myší liečených orálnym PPS sodným ako u myší neliečenej (kontrolnej) skupiny. Tento diferenciál indikuje, že v glomerulách liečených zvierat bolo výrazne menej kolagénu jazvového typu v porovnaní s neliečenými zvieratami, čo je skutočnosť, ktorá sa potvrdila histologickým vyšetrením a imunofluorescenčnou mikroskopiou.

Príklad 6

Štúdie s králikmi Watanabe

Králiky Watanabe¹ slúžia ako zvierací model prirodzenej endogénnej hypercholesterolémie. Tento znak sa prejavuje úplne v homozygótnom stave, čiastočne sa prejavuje v heterozygótnom stave a je spôsobený jednogénovým defektom. Homozygótné králiky Watanabe majú sérové koncentrácie cholesterolu 8 až 14 krát vyššie ako normálne japonské biele králiky.

Králiky Watanabe majú veľmi vysokú incidenciu aterosklerotických plakov, najmä v aorte. Rýchlosť vývoja a závažnosť aterosklerózy sa dá zvýšiť kŕmením králikov diétou bohatou na cholesterol.

Nasledujúce dve štúdie sa uskutočnili, aby sa zistila antiaterosklerotická aktivita PPS u králikov Watanabe:

Štúdia A: Subkutánne vyhodnotenie PPS

Dvanásť králikov Watanabe sa rozdelilo do dvoch skupín po šesť (skupina A a skupina B) a kŕmili sa diétou bohatou na cholesterol (0,5 % cholesterolu). Zvieratám skupiny A sa denne podával subkutánne normálny fyziologický roztok, zatiaľ čo zvieratám skupiny B sa denne subkutánne podávalo 10 mg/kg PPS sodného (Elmiron®).

Štyri zo zvierat liečených PPS (skupina B) uhynuli pred dokončením štúdie, jedno v deň 22 a tri medzi dňom 80 a 86. Na deň 89 sa na zvieratách skupiny A a dvoch ostávajúcich zvieratách skupiny B uskutočnila eutanázia a nekropsia a ich tkanivá sa vyhodnotili, konkrétne rezy z rôznych veľkých vetiev aorty.

Výsledky:

Ako vidno z nižšie uvedenej tabuľky 1, zistilo sa, že zvieratá z liečenej skupiny B majú oveľa menšie nánosy plaku a oveľa vyšší pomer vrstvy hladkej svaloviny k plaku (až 6,8 krát vyšší) v porovnaní s kontrolnými králikmi skupiny A vo

¹ Toto plemeno králikov je technicky známe ako dedične hyperlipidemický králik Watanabe (WHHL - Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit).

všetkých skúmaných aortálnych rezoch. Tieto zistenia sú vizuálne ilustrované na fotografiách na obrázku 11. Rez brušnej aorty zo zvieraťa z kontrolnej skupiny ukazuje vysoko vyvinutý aterosklerotický plak so značnou prierezovou plochou. Rez z brušnej aorty zvieraťa liečeného PPS sodným neukazuje takmer žiadne znaky plaku, hoci zvieratám z liečenej skupiny sa podávala diéta s rovnako vysokým obsahom cholesterolu ako v kontrolnej skupine.

Tabuľka 1

Králiky Watanabe

Morfometria aortálnych lézií

		Kontrola (cm ²)	Hladká svalovi- na/plak	PPS (cm ²)	Hladká svalovi- na/plak	Násobok zníženia veľkosti plaku (x)
Ascendentná aorta	vrstva hladkej svaloviny	0,328	0,61	0,243	4,12	6,8 x
	plak	0,54		0,59		
Aortálny oblúk	vrstva hladkej svaloviny					
	plak					
Hrudníková aorta	vrstva hladkej svaloviny	0,244	0,47	0,334	1,184	2,5 x
	plak					
Brušná aorta	vrstva hladkej svaloviny	0,265	0,74	0,303	7,58	10,2 x
	plak	0,358		0,04		

Štúdia B: orálne vyhodnotenie PPS

Dvadsať králikov Watanabe sa rozdelilo do štyroch skupín po päť, skupiny A až D. Všetkým králikom sa podávala rovnaká diéta s vysokým obsahom cholesterolu (0,5 % cholesterolu). Zvieratám skupín A a B sa podávala na pitie voda z vodovodu, zatiaľ čo zvieratá skupín C a D dostávali vodu z vodovodu obsahujúcu 0,5 mg/ml PPS sodného (Elmiron®). Na základe pozorovaní spotreby

vody zvieratami pred štúdiou bola celková dávka PPS sodného skonzumovaná každým zvieraťom v liečených skupinách 30 mg/kg.

Dva z liečených králikov boli vyradené zo štúdie v deň 4 a 11 v dôsledku abscesov zjavne nesúvisiacich s PPS.

Na zvieratách skupín A a C sa vykonala eutanázia a nekropsia v deň 50 štúdie a vyšetrili sa ich aorty. Medzi intimami zvierat skupiny A (kontrola) a skupiny C (liečené) sa vizuálne pozorovali signifikantné rozdiely, pričom druhá skupina vykazovala nižší vývoj aterosklerotického plaku.

Na králikoch skupín B a D sa uskutočnila eutanázia a nekropsia v deň 64 štúdie. Aorty týchto skupín sa vyšetrili histologicky a zmerali sa príslušné prierezy intimálnych a mediálnych vrstiev v rôznych vetvách aorty.

Obrázok 12 je stĺpcový graf vyjadrujúci stredné intimálne plochy namerané na rezoch odobraných z rôznych vetiev aort králikov kontrolnej skupiny (skupina B) a liečenej skupiny (skupina D). Obrázok 12 ilustruje, že v každom vyšetrenom aortálnom oblúku bola intimálna plocha podstatne nižšia u liečených zvierat v porovnaní s neliečenými, čo naznačuje, že v liečenej skupine bolo podstatne menej aterosklerotických lézií a nánosov plaku.

Obrázok 13 ukazuje stredné hodnoty pre pomer intimálnych a mediálnych plôch v tých istých aortálnych rezoch odobratých z králikov skupiny B a D, ako je opísané vzhľadom na obrázok 12. Tento pomer, ktorý je odrazom relatívneho množstva jazvového tkaniva a plakov usadených na stenách ciev (ktoré usadeniny zvyšujú prierezovú plochu intimy), bol nižší v každej aortálnej vetve liečených králikov (skupina D) v porovnaní s neliečenými zvieratami (skupina B).

Predchádzajúce údaje vytvorené vedecky overenými experimentálnymi postupmi demonštrujú účinnosť PPS pri zvyšovaní syntézy nadbytočného mimobunkového matrixového kolagénu a istých bunkových rastových faktorov so zvyšovaním aktivity enzýmov degradácie kolagénu. Tieto účinky naznačujú, že PPS by mal byť vysoko účinný v klinickom manažmente a obrátení CPVSD, najmä arteriosklerózy a aterosklerózy.

Ukázalo sa teda, že sa ponúkajú metódy a kompozície, ktoré dosahujú rôzne ciele vynálezu a ktoré sú dobre usposobené na vyhovenie podmienkam praktického použitia.

Keďže možno uskutočniť rôzne uskutočnenia vyššie uvedeného vynálezu a vo vyššie uvedených uskutočneniach možno urobiť rôzne zmeny, rozumie sa, že všetky záležitosti tu opísané treba chápať ako ilustratívne a nie v obmedzujúcom zmysle.

Čo sa nárokuje ako nové a čo má byť chránené patentom, je zakotvené v nasledujúcich nárokoch.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie pentózanu polysulfátu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie pacienta - cicavca trpiaceho chronickou progresívnou chorobou zjazvovania ciev, ktorá v postihnutej vaskulatúre spôsobuje zužovanie lúmenu a znižovanie rozťahovateľnosti.
2. Použitie podľa nároku 1, kde postihnutou vaskulatúrou je artéria.
3. Použitie podľa nároku 2, kde uvedenou artériou je aorta alebo niektorá jej veľká vetva.
4. Použitie podľa nároku 2, kde uvedenou chorobou je forma artériosklerózy charakteristická zjazvením.
5. Použitie podľa nároku 4, kde uvedená forma artériosklerózy je ateroskleróza a uvedené zjazvenie zahŕňa steny artérií postihnuté aterosklerotickými plakmi.
6. Použitie podľa nároku 1, kde celková denná dávková forma obsahuje 5 až 30 mg uvedenej farmaceutickej kompozície alebo 350 až 2 000 mg pentózan polysulfátu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli na kg telesnej hmotnosti pacienta.
7. Použitie podľa nároku 6, kde uvedená denná dávková forma je 500 až 1 500 mg.
8. Použitie podľa nároku 6, kde uvedená denná dávková forma obsahuje jednu až štyri rovnomerne rozdelené dávky.
9. Použitie podľa nároku 1, kde uvedená farmaceutická kompozícia je v liekovej forme na orálne podávanie.
10. Použitie podľa nároku 9, kde uvedená lieková forma je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z konvenčných alebo rovnomerne uvoľňujúcich tabliet, kapsúl, pastiliek, kvapalín a elixírov.
11. Použitie podľa nároku 9, kde uvedená lieková forma zahŕňa aspoň jednu farmaceuticky prijateľnú inertnú prísadu.

12. Použitie podľa nároku 11, kde uvedená inertná prísada je plnivo, spojivo, rozpúšťadlo, vehikulum alebo nosič.
13. Použitie podľa nároku 9, kde uvedená lieková forma obsahuje 50 až 300 mg na jednotku pentózan polysulfátu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli.
14. Použitie podľa nároku 1, kde uvedenou farmaceuticky prijateľnou soľou je sodná soľ.
15. Použitie podľa nároku 14, kde uvedená kompozícia je vo forme želatínovej kapsule obsahujúcej pentózan polysulfát sodný, mikrokryštalickú celulózu a stearan horečnatý.
16. Použitie podľa nároku 1, kde uvedeným pacientom je ľudský pacient.

1/14

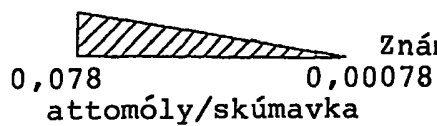
Kompetitívna PCR na 1/10 normálneho
glomerulu na α_1 IV kolagén

Množstvo cDNA

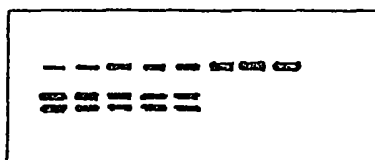


Neznáme množstvo

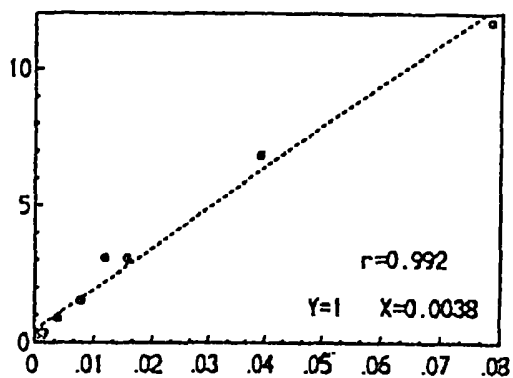
Mutantná cDNA



Známe množstvo



Pomer
mutant/množstvo



Zavedený mutant
(attomóly)

2/14



Obr. 2C



Obr. 2D

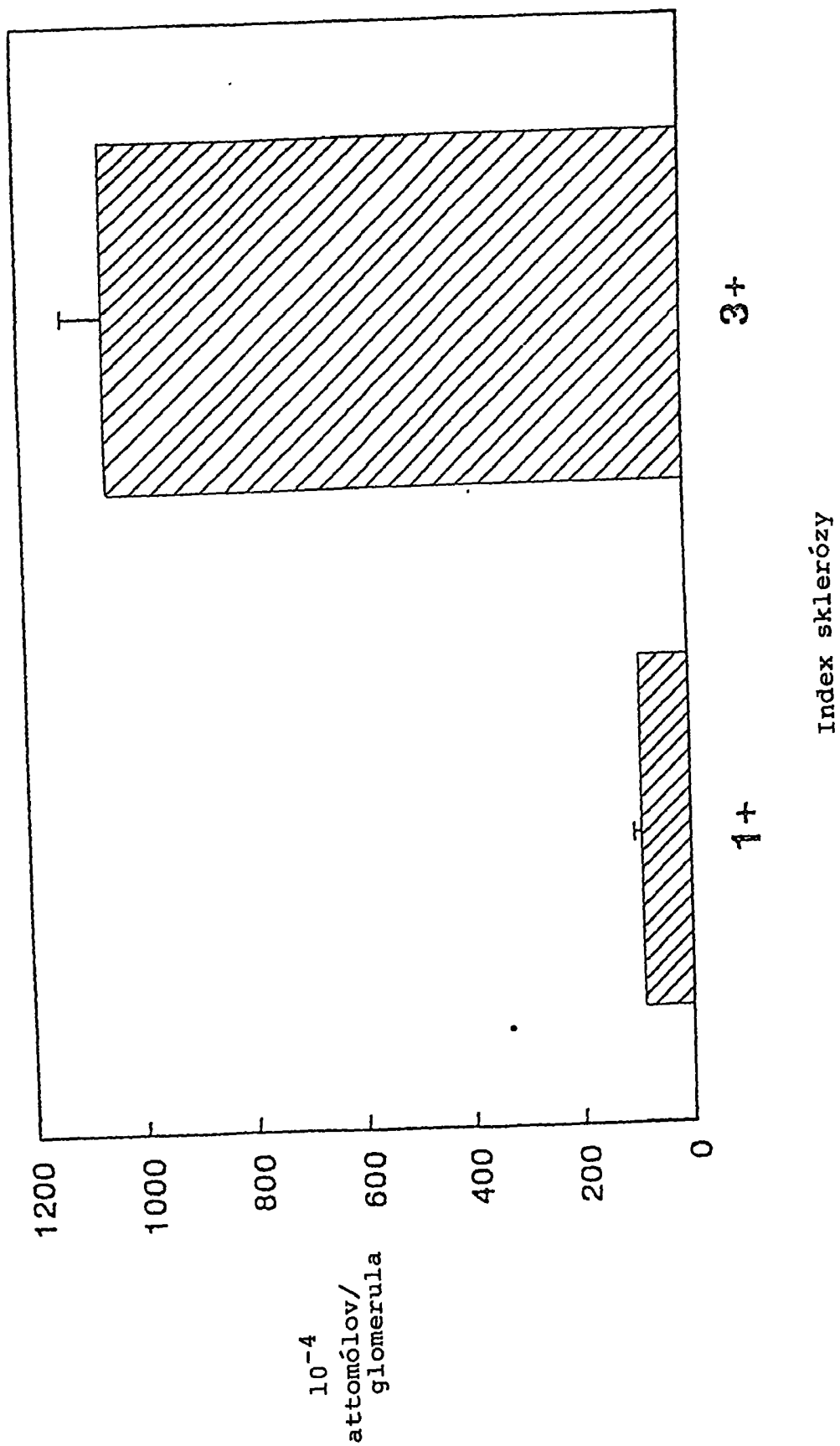


Obr. 2A



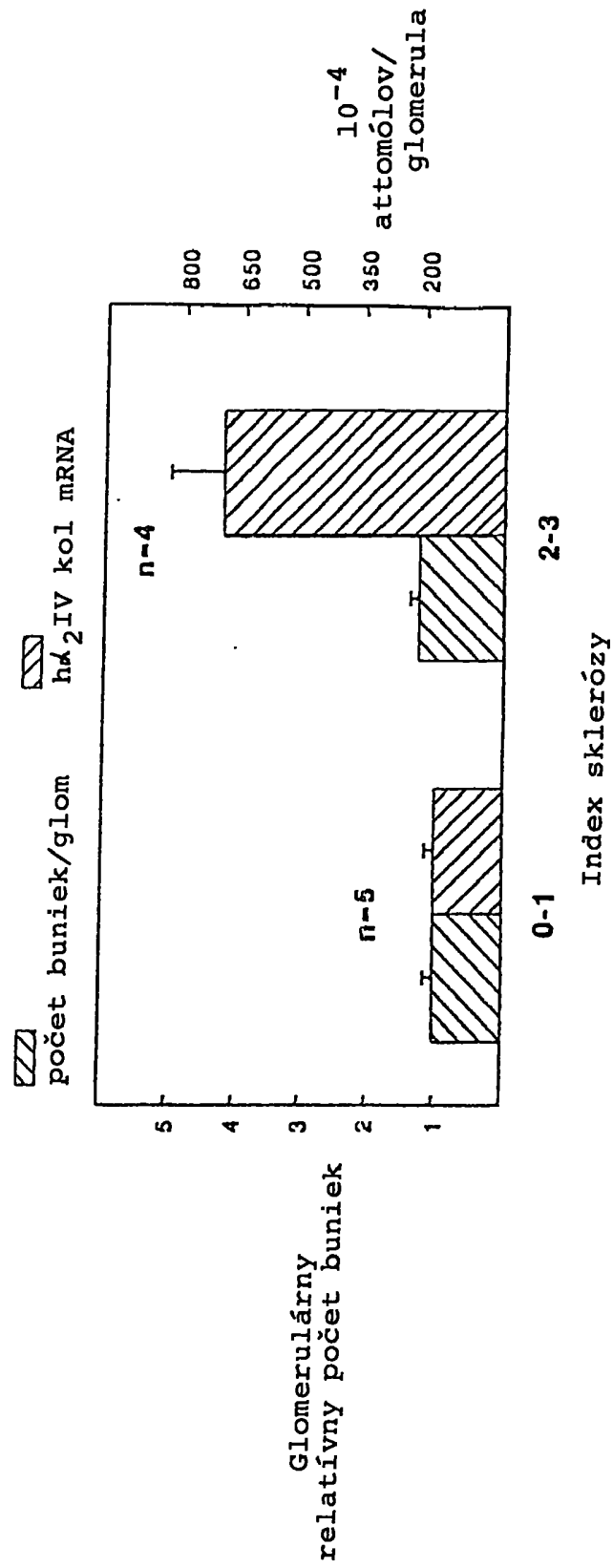
Obr. 2B

3/14



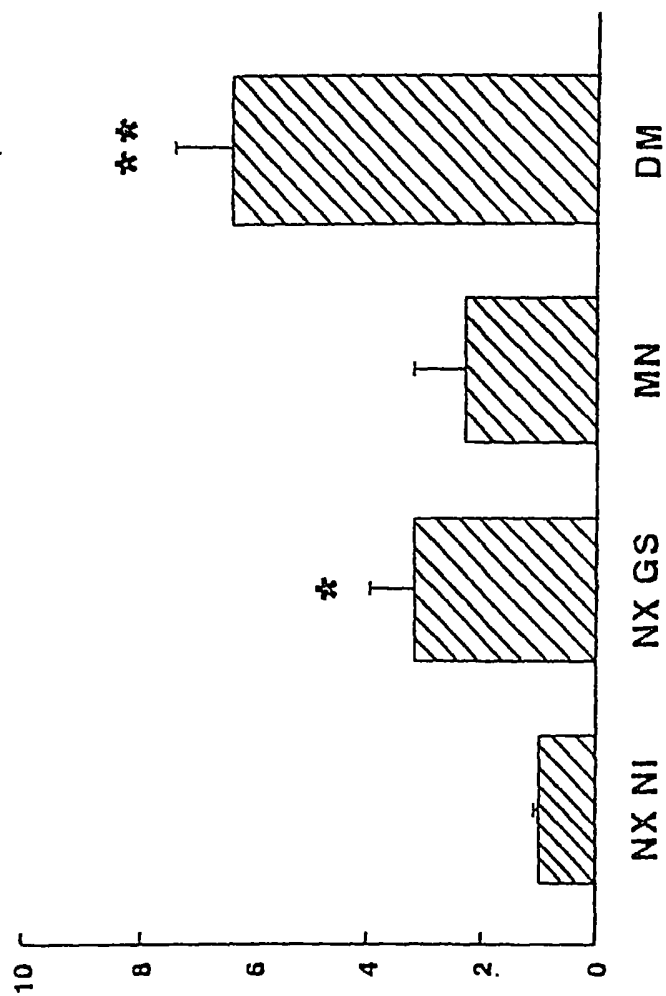
Obr. 2E

Obr. 3



5/14

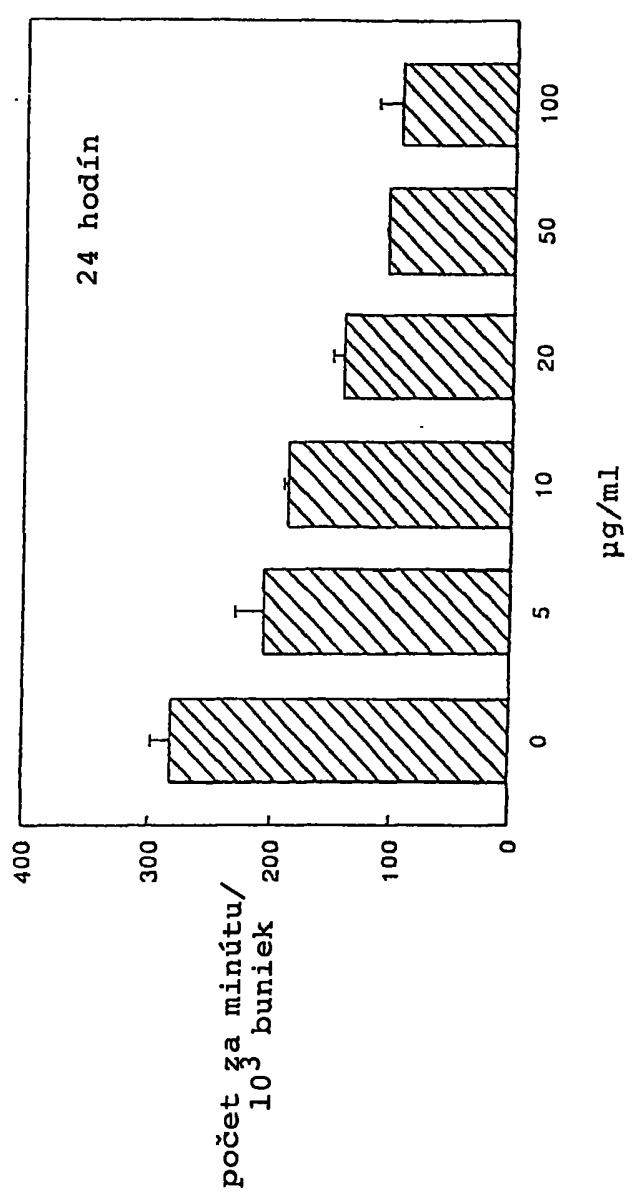
Obr. 4



Pomer mRNA kolagénu
 α_2/α_{3IV}

Obr. 5

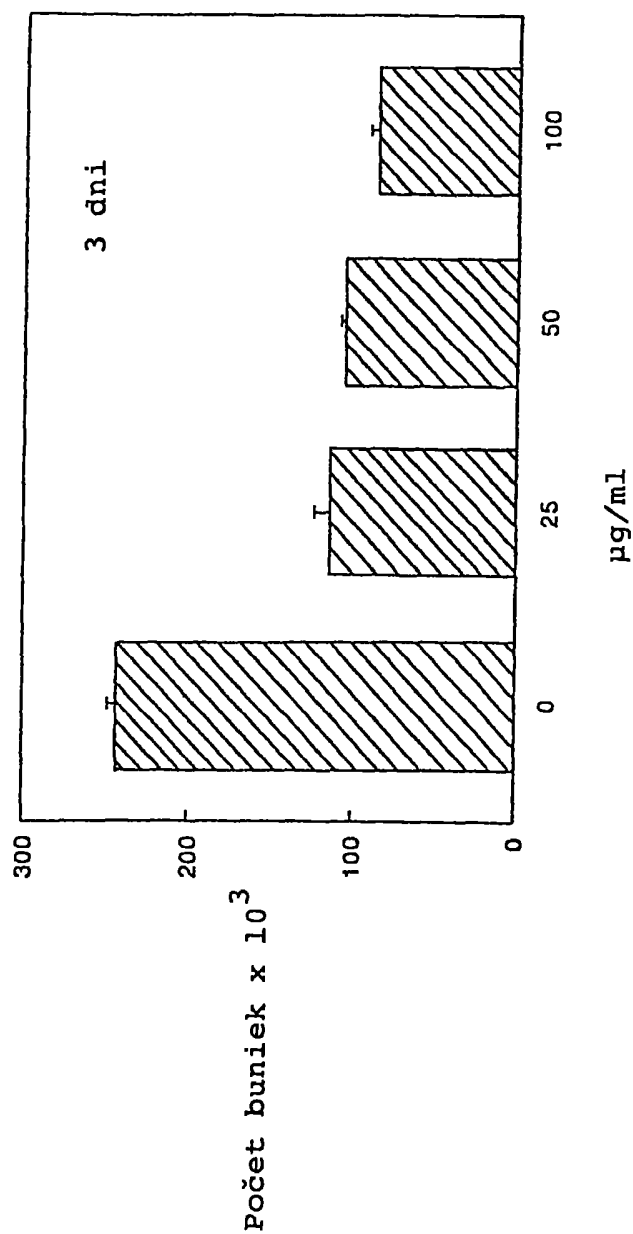
Účinek PPS na syntézu DNA
Zabudovanie H³-tymidínu



7/14

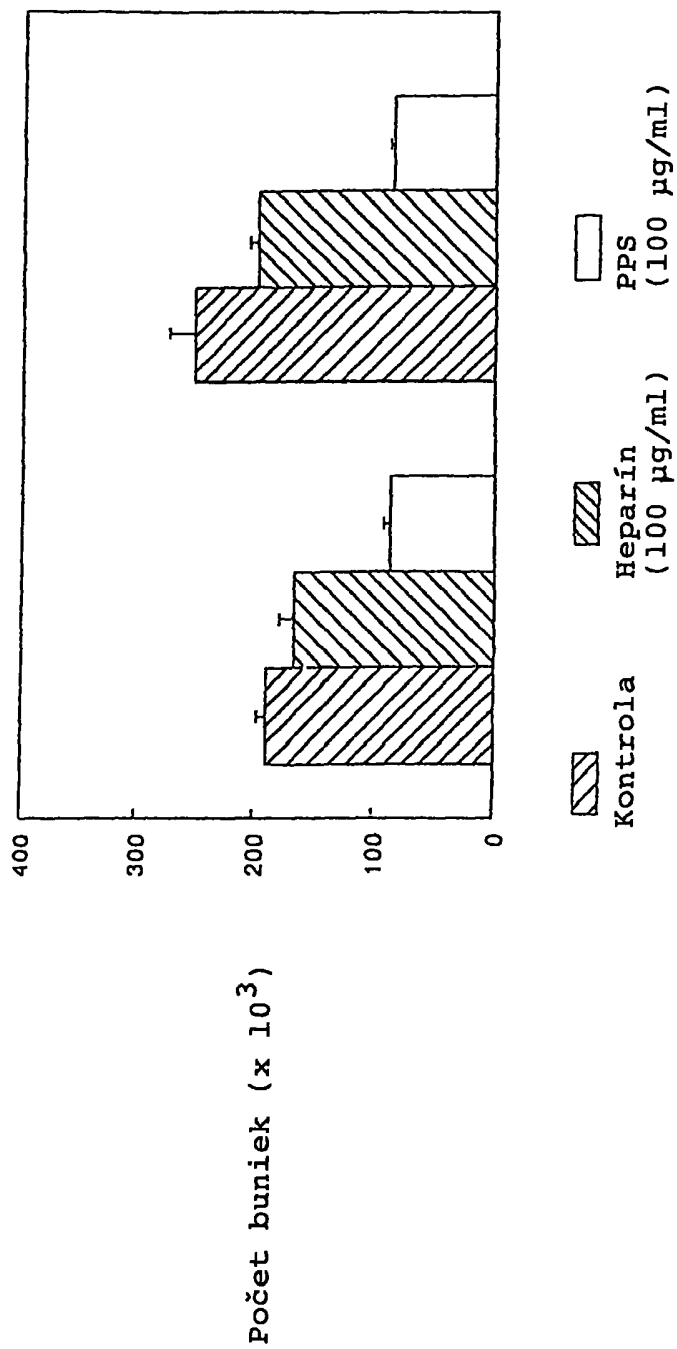
Obr. 6

Účinek PPS na rast buniek



Obr. 7

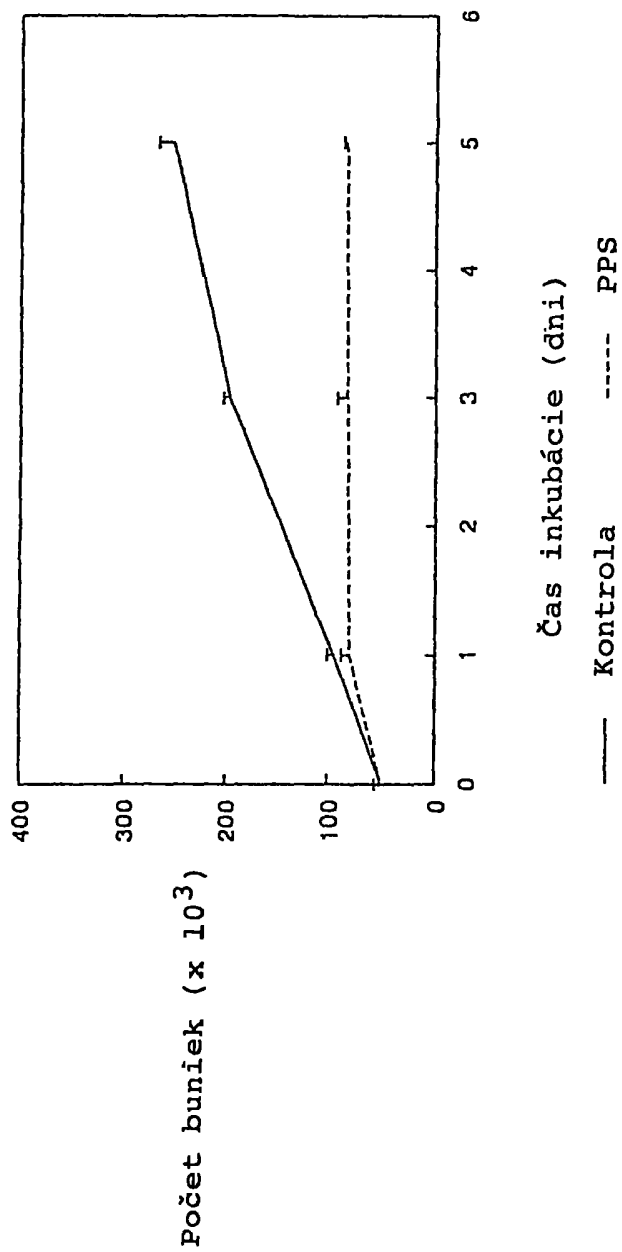
Porovnanie rastu buniek
PPS proti Heparínu



9/14

Obr. 8

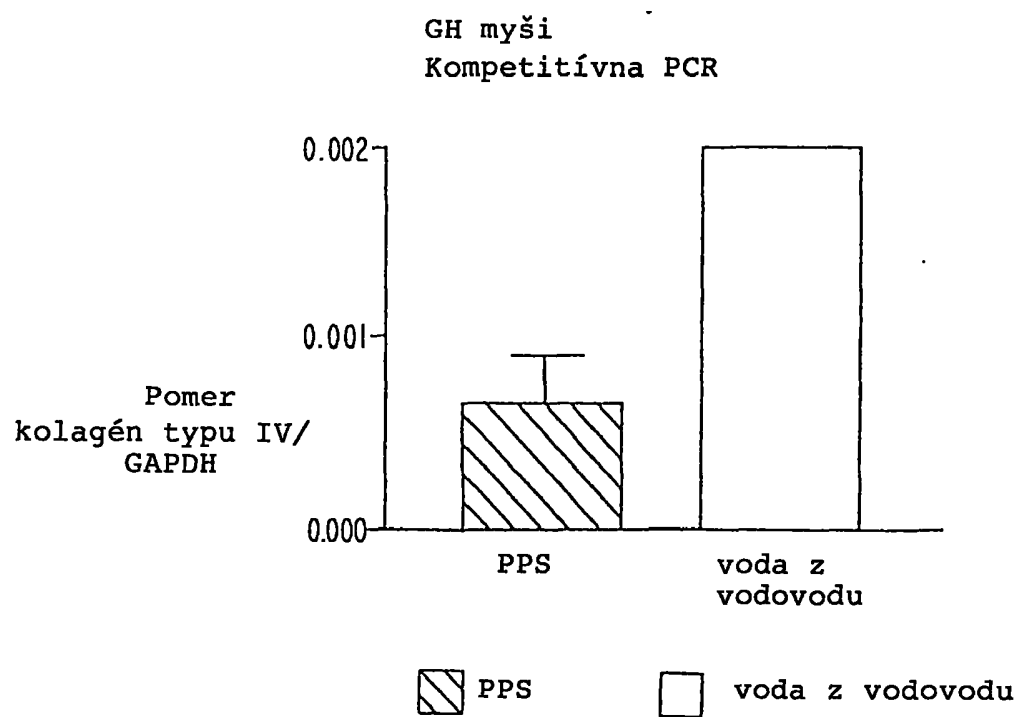
Účinok PPS na poliferačiu buniek
(100 µg/ml)



Obr. 9

Účinky PPS na hladinách mRNA Molekuly					
	α IV	α II	72KDa	92KDa	TGF-b β -aktín
Dni					
1	-	-	-	-	-
3	-	↓	-	↑	↓
5	-	↓	-	↑	↓

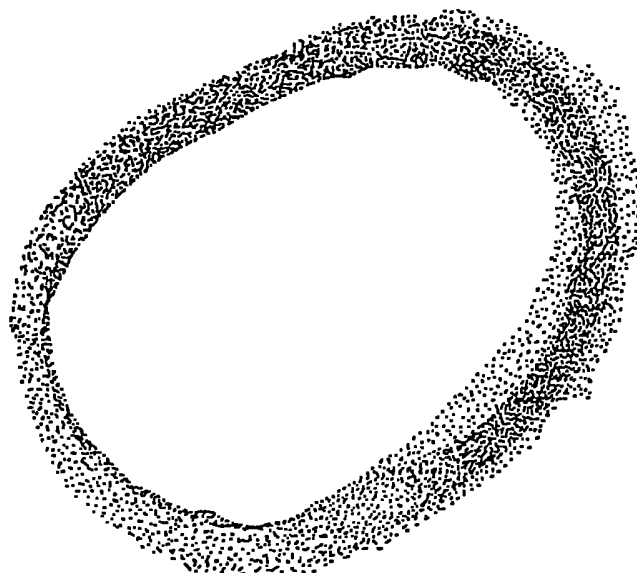
Obr. 10



12/14

Králík Watanabe, brušná aorta

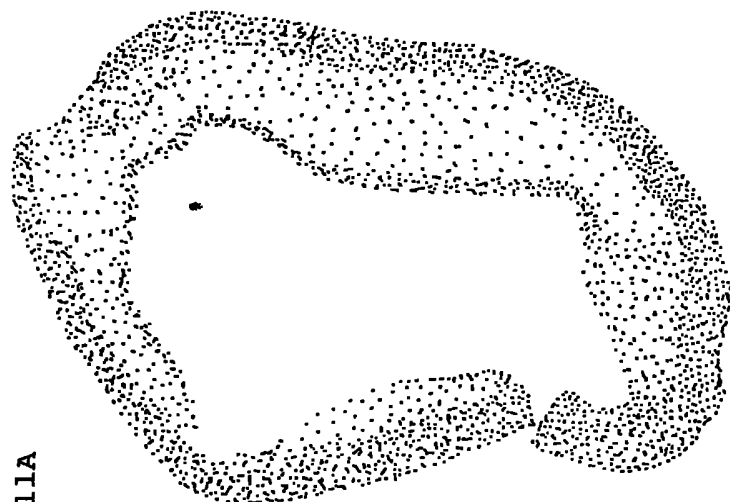
Obr. 11B



PPS

Králík Watanabe, brušná aorta

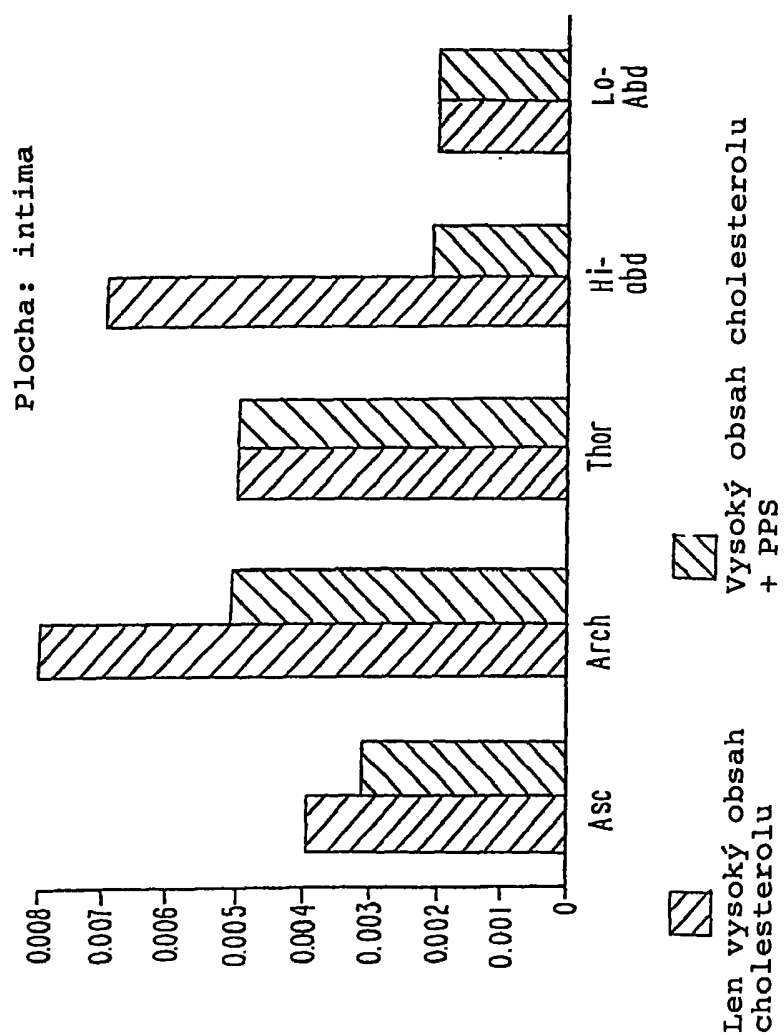
Obr. 11A



Kontrola

Obr. 12

Watanabe; Diéta s vysokým obsahom cholesterolu, Vek 30 až 90 dní



Obr. 13

Watanabe, Diéta s vysokým obsahom cholesterolu, Vek 30 až 90 dní
pomer: int/med

