SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA SLOVENSKEJ
REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) 27.10.93

(31) 98028, 989298

(32) 02.05.91, 18.05.91

(33) IL, IL

(43) 06.07.94

(86) PCT/US92/03626

(21) **1201-93**

(13) **A3**

(51) **A 61 K 31/725**

(71) YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., Rehovot, IL;

(72) COHEN Irun R., Rehovot, IL; LIDER Ofer, Rehovolt, IL; HERSHKOVITZ Rami, Herzliyya, IL;

(54) **Farmaceutický prostriedok na prevenciu a/ alebo liečenie patologických stavov**

(57) Riešenie sa týka farmaceutického prostriedku na prevenciu a/ alebo liečenie patologických stavov, súvisiacich s indukciou sekrécie TNF-alfa, prostriedok obsahuje farmaceuticky prijateľný nosič a heparín s nízkou molekulovou hmotnosťou (LMWH). Vo farmaceutickom prostriedku je LMWH prítomný v nízkej účinnej dávke, prostriedok sa podáva v intervaloch 5 až 8 dní. LMWH s uvedenou nízkou molekulovou hmotnsťou je okrem toho schopný spôsobiť inhibíciu sekrécie TNF-alfa in vitro T -bukami v kľudovom stave a/ alebo makrofágmi ako odpovede na antigény špecifické pre T-bunky, mitogény, aktivátory makrofágov, rozrušenú extracelulárnu matricu (dECM), laminín, fibronectín a pod..

PV1201-93

Farmaceutický prostriedok na prevenciu a/alebo liečenie patologických stavov

Oblasť techniky

Vynález sa týka farmaceutických prostriedkov na prevenciu a/alebo liečenie patologických stavov, pri ktorých dochádza k indukcii sekrécie faktora alfa nekrózy nádorov (TNF-alfa).

Doterajší stav techniky

TNF-alfa, cytokín, produkovaný monocytmi (makrofágmi) a T-lymfocytmi, je kľúčovým prvkom v kaskáde faktorov, ktoré vyvolávajú zápalovú odpoveď a v dôsledku jeho rôznorodých účinkov dochádza k vzniku chorobných stavov, ako bolo opísané v publikácii B. Beutler a A. Cerami, Ann. Rev. Immunol., 1989, 7:625 až 655.

Biologické účinky TNF-alfa závisia na jeho koncentrácii a na mieste jeho produkcie. Pri nízkych koncentráciách môže TNF-alfa vyvolať žiaduce homeostatické a obranné funkcie, avšak vo vysokých koncentráciách, systemicky alebo v niektorých tkanivách môže TNF-alfa mať účinok, synergný s účinkom ďalších cytokínov, najmä interleukínu (IL-1), čím dochádza k zhoršeniu mnohých zápalových odpovedí.

Bolo preukázané, že pôsobením TNF-alfa (spolu s IL-1) môže dôjsť k zhoršeniu nasledujúcich stavov: horúčka, spánok, charakterizovaný na EEG pomalými vlnami, hemodynamický šok, zvýšená produkcia bielkovín v akútnej fáze, znížená produkcia albumínu, aktivácia endoteliálnych buniek ciev, zvýšená expresia molekúl hlavného komplexu histokompatibility (MHC), zníženie lipoproteínlipázy, zníženie cytochrómu P450, znížené množstvo zinku a železa v plazme, proliferácia fibroblastov, zvýšenie kolagenázy v synoviálnych bunkách, zvýšenie účinnosti cyklooxygenázy, aktivácia T-buniek

a B-buniek a indukcia sekrécie cytokínov a to samotného TNF-alfa, IL-1 a IL-6.

Spôsob, akým k vyvolaniu účinkov TNF-alfa dochádza, nie je ešte do všetkých podrobností známy, avšak rad účinkov je zrejme spojený so schopnosťou TNF-alfa stimulovať bunky k produkcii prostaglandínov a leukotrienov z arachidonovej kyseliny bunkovej membrány.

TNF-alfa sa v dôsledku svojich mnohostranných účinkov pravdepodobne zúčastňuje pri vzniku rôznych patologických stavov v rade rôznych orgánov. V krvných cievach podporuje TNF-alfa vznik hemoragického šoku, znižuje hladinu trombomodulínu v endoteliálnych bunkách a podporuje účinnosť prokoagulačných faktorov. Spôsobuje adhéziu leukocytov a pravdepodobne aj krvných doštičiek na steny ciev a tak môže vyvolať pochody, vedúce k vzniku arteriosklerózy a vaskulitídy.

TNF-alfa aktivuje krvné bunky s spôsobuje adhéziu neutrofilných buniek, eosinofilných buniek, monocytov/makrofágov a T- a B- lymfocytov. Indukciou produkcie IL-1 a IL-6 zvyšuje TNF-alfa chemotaxiu zápalových buniek a ich prenikanie do tkanív. Týmto spôsobom napomáha TNF-alfa poškodeniu tkaniva pri autoimunologických chorobách, pri alergiách a aj pri odmietaní tkanivových štepov.

V niektorých prípadoch bol TNF-alfa označovaný ako kachektín vzhľadom na to, že mení metabolickú aktivitu tukových buniek a prispieva k chudnutiu a kachexii, ktorá sprevádza zhubné nádory, chronické infekcie, chronické zlyhanie srdca a chronické zápalové stavy. TNF-alfa môže tiež hrať svoju úlohu pri vzniku anorexia nervosa tak, že znižuje chuť do jedla a súčasne urýchľuje spotrebovávanie tukového tkaniva.

TNF-alfa má metabolické účinky aj na kostrové svalstvo

a na srdcový sval. Má aj význačné účinky na pečeňové tkanivo: znižuje metabolizmus albumínu a cytochrómu P450 a zvyšuje produkciu fibrinogénu, alfa-1-kyslého glykoproteínu a ďalších bielkovín akútnej fázy. Môže spôsobiť aj nekrózu močového mechúra alebo hrubého čreva.

V centrálnom nervovom systéme preniká TNF-alfa mozgomiechovou bariérou a vyvoláva zvýšenie teploty, spavosť a nechuť k jedlu. Koncentrácia TNF-alfa je zvýšená aj u roztrúsenej sklerózy. Ďalej môže TNF-alfa spôsobiť krvácanie do nadobličiek a ovplyvniť produkciu stereoidných hormónov, ďalej zvyšuje účinnosť kolagenázy a PGE-2 v koži a spôsobuje odbúravanie kostného a chrupavkového tkaniva aktiváciou osteoklastov.

Je teda možné zhrnúť, že TNF-alfa sa zúčastňuje pri patogenézii radu nežiaducich zápalových stavov pri autoimunologických ochoreniach, odmietnutí transplantátov, vaskulitíde a ateroskleróze. Môže hrať svoju úlohu aj pri srdcovom zlyhaní, pri reakcii na zhubný nádor a pri anorexia nervosa. Z uvedených dôvodov boli hľadané spôsoby riadenia sekrécie TNF-alfa ako cesty na liečenie uvedených ochorení.

Primárnou funkciou imunologického systému je ochrana jedinca pred infekciou cudzorodými organizmami, napríklad mikroorganizmami. Imunologický systém však môže napadnúť aj vlastné tkanivo a potom dochádza k patologickým stavom, označovaným ako autoimunologické ochorenia. Agresívne reakcie imunologického systému proti tkanivám z iného jedinca sú potom príčinou nežiaduceho odmietnutia transplantovaných orgánov. Hyperreaktivita systému proti cudzorodým látkam spôsobuje príznaky alergie ako je astma, alergická nádcha a ekzémy.

Bunkami, ktoré túto reakciu uskutočňujú sú lymfocyty, primárne aktivované T-lymfocyty a patologická zápalová odpoveď, ktorá vzniká, závisí na ich schopnosti putovať stenami

krvných ciev a vycestovať z nich k cieľovým tkanivám. To znamená, že v prípade, že sa zníži schopnosť lymfocytov ľnúť k cievnym stenám a týmito stenami prenikať, bude možné zabrániť aj autoimunologickým ochoreniam, odmietnutiu transplantátov a alergiám. Znamená to nový liečebný prístup, ktorým by mohol byť dosiahnutý vyšší účinok a znížené množstvo nežiaducich vedľajších reakcií v porovnaní s dosiaľ užívanými liečebnými postupmi.

Ateroskleróza a vaskulitída sú príkladom akútneho a chronického zápalu ciev. Pri ateroskleróze dochádza k postupnému zhrubnutiu tunica intima tepien a k strate jej pružnosti, čo vedie ku koronárnym ochoreniam, infarktu myokardu, mozgového infarktu a ochoreniu periférnych ciev, ide o najčastejšiu príčinu chorobnosti a úmrtnosti vo vyvinutej časti sveta v súčasnej dobe. Ateroskleróza sa vyvíja pomaly ako poškodenie, vyvolané ukladaním tukového materiálu a vápenatých usadenín. Proliferácia fibróznych tkanív potom nakoniec vedie k akútnemu stavu, pri ktorom dochádza k vzniku náhlych uzáverov krvných ciev.

Bolo preukázané, že TNF-alfa uľahčuje a zvyšuje replikáciu vírusu imunodeficiencie HIV in vitro, podľa Matsuyama T a ďalší, J. Virol., 1989, 63(6):2504 až 2509, Michihiko S. a ďalší, Lancet, 1989, 1(8648):1206 až 1207) a tiež stimuluje expresiu génu HIV-1 a tým pravdepodobne vyvoláva vznik klinického syndrómu AIDS u jednotlivcov s latentnou infekciou HIV-1 podľa Okamoto T. a ďalší, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1989, 5(2):131 až 138.

Heparín je glykozaminoglykan, to znamená polyaniónový sulfatovaný polysacharid, ktorý sa klinicky používa na zabránenie zrážania krvi, ako antitrombotická látka. Na živočíšnom modeli bolo preukázané, že heparín znižuje schopnosť autoimunologických T-lymfocytov dosiahnuť ich cieľových orgánov podľa Lider O. a ďalší, Eur. J. Immunol 1990, 20: 493 až 499. Bolo taktiež preukázané, že heparín je schopný

potlačiť experimentálne autoimunologické ochorenie u potkanov a predĺžiť prežívanie cudzorodých štepov na modeli transplantácie kože u myší v prípade použitia v nízkych dávkach (5 µg pre myš a 20 µg pre potkana) pri injekčnom podaní raz denne podľa Lider O. a ďalší, J. Clin. Invest. 1989, 83: 752 až 756.

Mechanizmus uvedených účinkov spočíva pravdepodobne v tom, že u T-lymfocytov dochádza k inhibícii uvoľňovania enzýmov, nevyhnutných pre prenik cievnou stenou, v prvom rade enzýmu heparanázy, ktorá špecificky napadá glykozaminoglykanovú skupinu subendoteliálnej extracelulárnej matrice (ECM), ktorá lemuje krvné cievy podľa Naparstek Y. a ďalší. Nature, 1984, 310:241 až 243. Expresia enzýmu heparanázy je spojená so schopnosťou autoimunologických T-lymfocytov prenikať stenou krvných ciev a poškodzovať mozgové tkanivo na experimentálnom modeli autoimunologickej encefalomyelitídy (EAE).

Európsky patentový spis EP 114 589 (Folkman a ďalší) opisuje farmaceutický prostriedok na inhibíciu angiogenézy u cicavcov, účinná zložka tohto prostriedku je tvorená v podstate 1) heparínom alebo fragmentom heparínu a to hexasacharidom alebo väčším fragmentom s 2) kortizónom alebo hydrokortizónom alebo 11-alfa-izomérom hydrokortizónu. Podľa uvedeného patentového spisu je heparín ako taký alebo hydrokortizón ako taký neúčinný a len kombináciou oboch týchto látok je možné dosiahnuť požadovaný účinok. Hoci v literatúre nebol podaný žiadny dôkaz existencie spojenia medzi angiogenézou a autoimunologickými ochoreniami, spája sa na str. 5 opisnej časti uvedeného spisu angiogenéza s psoriázou a artritídou a uvádza sa v tomto prípade použitie vysokých dávok, 25 000 až 47 000 jednotiek heparínu denne.

Horváth J. E. a ďalší, Aust. N. Z. J. Med., 1975, 5(6): 537 až 539 opisujú účinok subantikoagulačných dávok heparínu pri podkožnom podaní na včasnú funkciu transplantovanej

obličky. Denná dávka je vysoká, 500 jednotiek a práca uvádza, že heparín v subantikoagulačných dávkach nemá žiadny vplyv na včasnú funkciu transplantátu, naviac môže dôjsť k zvýšeniu výskytu hemoragických komplikácií.

Tivanen M. L. a ďalší, Meth. and Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1982, 4(6):359 až 363 sledovali účinok heparínu vo vysokých dávkach 1000 jednotiek na potkana pri inhibícii vzniku adjuvantnej artritídy u potkanov a pozorovali, že heparín zvýšil závažnosť tohoto ochorenia u potkanov.

PCT patentová prihláška PCT/AU88/00017, zverejnená pod č. WO88/05301 (Parish a ďalší) opisuje sulfatované polysacharidy, ktoré blokujú alebo inhibujú účinnosť endoglykozylázy, napríklad na použitie ako antimetastatické a protizápalové látky. Heparín a niektoré deriváty heparínu, napríklad heparíny, oxidované jodistanom alebo redukované heparíny, ktoré mali len zanedbateľnú antikoagulačnú účinnosť, mali antimetastatickú a protizápalovú účinnosť pri použití v dávkach 1,6 až 6,6 mg na potkana a deň pri podávaní vo forme infúzie (čo zodpovedá dávke v rozmedzí 75 až 308 mg denne u dospelého človeka).

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoria farmaceutické prostriedky na prevenciu a/alebo liečenie patologických stavov, pri ktorých dochádza k indukcii sekrécie faktora alfa nekrózy nádorov, TNF-alfa, tieto farmaceutické prostriedky obsahujú farmaceuticky prijateľný nosič a heparín s nízkou molekulovou hmotnosťou LMWH, prítomný v nízkej účinnej dávke pre podanie v intervaloch 5 až 8 dní, LMWH je in vitro schopný spôsobiť inhibíciu sekrécie TNF-alfa T-bunkami v kľudovom stave a/alebo makrofágmi ako odpovede na antigény, špecifické pre T-bunky, mitogény, aktivátory makrofágov, rozrušenú extracelulárnu matricu (dECM), laminín, fibronectín alebo iné zložky ECM.

Vo zvláštnom vykonaní má LMWH vo farmaceutickom prostriedku strednú molekulovú hmotnosť v rozmedzí 3000 až 6000 a prostriedok je možné podávať každý piaty deň.

Podstatu vynálezu tvorí aj farmaceutický prostriedok, podávaný v intervaloch 5 až 8 dní na prevenciu a/alebo liečenie patologických stavov, pri ktorých dochádza k indukcii sekrécie TNF-alfa a ktorý obsahuje farmaceuticky prijateľný nosič a heparín s nízkou molekulovou hmotnosťou LMWH v nízkej účinnej dávke, pričom LMWH je schopný spôsobiť inhibíciu experimentálne vyvolanej hypersenzitivity oneskoreného typu (DTH) ako reakciu na podaný antigén, ako je možné preukázať zmenšením zatvrdnutia, ku ktorému dochádza po aplikácii antigénu na kožu päť až sedem dní po podaní farmaceutického prostriedku v porovnaní so zatvrdnutím, pozorovaným po podaní antigénu na kožu v neprítomnosti alebo po odznení účinku farmaceutického prostriedku. Príkladom použitého antigénu môže byť napríklad antigén tetanu, bázický myelín, čistené deriváty bielkoviny, oxazolón a podobne.

Okrem toho tvoria podstatu vynálezu aj farmaceutické prostriedky, ktoré je možné podávať v závislosti na okolnostiach napríklad enterálne (včítane perorálneho podania) alebo parenterálne (včítane miestneho podania alebo podania inhaláciou vo forme aerosolu). Vo výhodných vykonaniach sa farmaceutické prostriedky podľa vynálezu podávajú podkožne alebo vnútrožilovo.

Farmaceutické prostriedky podľa vynálezu je teda možné použiť napríklad na oddialenie alebo na zabránenie odmietnutia transplantátu a na liečenie alebo prevenciu celého radu patologických pochodov, ako sú pochody, súvisiace s autoimunologickými chorobami, alergie, zápalové ochorenia, najmä zápalové ochorenia hrubého čreva alebo získaný syndróm imunodeficiencie AIDS. Vynález je možné tiež využiť v prípade diabetu typu I, ochorenia peirodontu, pri uveitíde, u reumatických ochorení, najmä v prípade reumatoidnej artritídy,

u aterosklerózy, vaskulitídy alebo roztrúsenej sklerózy.

Farmaceutické prostriedky podľa vynálezu obsahujú nízku účinnú dávku LMWH a typicky obsahujú dávku pre jedno podanie, ktorá je nižšia než 5 mg LMWH, s výhodou v rozmedzí 0,3 až 3 mg, zvlášť 1 až 1,5 mg.

Vynález je založený na poznatku, že heparín s nízkou molekulovou hmotnosťou LMWH je schopný in vitro spôsobiť inhibíciu sekrécie TNF-alfa T-bunkami v kľudovom stave a/alebo makrofágmi ako odpovede na antigény, špecifické pre T-bunky, mitogény, aktivátory makrofágov, rozrušenú extracelulárnu matricu (dECM), laminín, fibronectín alebo iné zložky ECM. Je teda možné ho použiť na výrobu farmaceutických prostriedkov, určených na podávanie v intervaloch 5 až 8 dní na prevenciu a/alebo liečenie patologických stavov, zahrňujúcich indukciu sekrécie TNF-alfa. Farmaceutický prostriedok uvedeného typu obsahuje nízku účinnú dávku LMWH a farmaceuticky prijateľný nosič.

Ďalšie znaky vynálezu budú zrejmé z nasledujúceho opisu včítane opisu špecifických vykonaní vynálezu vo forme príkladov.

Podrobný opis vynálezu

Podľa vynálezu bolo zistené, že pri liečení podávaním heparínu s nízkou molekulovou hmotnosťou (LMWH) je možné spôsobiť inhibíciu sekrécie TNF-alfa T-bunkami a makrofágmi. Funkčným výrazom tohto účinku je u myší a u ľudí potlačenie hypersenzitivity oneskoreného typu (DTH), ide o zápalovú reakciu, spustenú bunkami typu makrofágov a ďalšími zápalovými bunkami. Liečením LMWH v dávkach, ktoré môžu ovplyvniť produkciu TNF-alfa je tiež možné dosiahnuť inhibíciu vzniku modelu autoimúnnej artritídy, označovanej ako adjuvantná artritída (AA). Liečenie LMWH taktiež predlžuje prežívanie cudzorodých transplantátov srdca u potkanov a zlepšuje na

inzulíne závislý diabetes mellitus (IDDM) u myší NOD. Okrem toho je možné liečením LMWH zabrániť indukcii produkcie TNF-alfa T-bunkami a makrofágmi ako odpovede na podnety, vychádzajúce z poškodených častí subendoteliálnej extracelulárnej matrice (ECM). Vzhľadom na to, že TNF-alfa má v mieste poškodenia ciev zrejme svoju úlohu pri vývoji aterosklerózy, bude možné inhibíciou produkcie TNF-alfa v mieste poškodenia subendoteliálnej ECM zrejme zlepšiť aterosklerotické stavy. Pri liečení pomocou LMWH je najviac prekvapujúca skutočnosť, že takéto liečenie je najúčinnejšie v prípade, že sa heparín podáva v nízkych dávkach v týždenných intervaloch. Vysoké dávky LMWH alebo denne podávané dávky LMWH nie sú pri inhibícii sekrécie TNF-alfa alebo imunologických reakciách účinné.

Heparíny s nízkou molekulovou hmotnosťou, produkované frakcionáciou alebo riadenou depolymeráciou heparínu majú výhodnejšie antitrombotické vlastnosti, avšak aj odlišné farmakokinetické vlastnosti v porovnaní s heparínom. Polčas je dvojnásobný a biologická dostupnosť je vyššia s ohľadom na antikoagulačný účinok po podkožnej injekcii, ako bolo opísané v publikácii Bratt G. a ďalší, Thrombosis and Haemostasis, 1985, 53:208 a Bone B. a ďalší, Thrombosis Research, 1987, 46:845.

Podľa vynálezu bolo teraz zistené, že LMWH, podaný v subantikoagulačných dávkach v intervaloch 7 dní je účinný pri prevencii a/alebo liečení patologických stavov, pri vzniku ktorých sa zúčastňuje indukcia TNF-alfa.

LMWH, používaný na účely vynálezu má strednú molekulovú hmotnosť 3000 až 6000, ide napríklad o látku, opísanú v EP 14 184. Niektoré typy LMWH sa bežne dodávajú pod rôznymi obchodnými názvami, napríklad Fragmin^{R}, Fraxiparin^{R}, Fraxiparine^{R}, Lovenox^{R} alebo Clexane^{R}.

LMWH je možné získať niekoľkými rôznymi spôsobmi: obo-

hatením frakcionácie etanolom a/alebo za použitia molekulového sita, napríklad filtrácie na géli alebo za použitia membrány na delenie štandardného heparínu a materiálu, získaného riadenou chemickou (pôsobením kyseliny dusitej, beta-eliminációu alebo oxidáciou jodistanom) alebo enzymatickou (pôsobením heparináz) depolymerizáciou. Podmienky depolymerizácie je možné starostlivo riadiť tak, aby bol získaný produkt s požadovanou molekulovou hmotnosťou. Obvykle sa vykonáva depolymerizácia pôsobením kyseliny dusitej. Tiež sa vykonáva depolymerizácia benzylesteru heparínu beta-eliminációu, čo poskytuje ten istý typ fragmentov ako enzymatická depolymarizácia za použitia heparináz. LMWH s nízkou antikoagulačnou účinnosťou a so zachovanou základnou štruktúrou je možné pripraviť depolymerizáciou s využitím oxidácie pôsobením jodistanu alebo odstránením frakcie LMWH, ktorá viaže antitrombín a pripravenej iným spôsobom, za použitia imobilizovaného antitrombínu na adsorpciu.

Fragmin^{R} je nízkomolekulárny heparín so strednou molekulovou hmotnosťou v oblasti 4000 až 6000, získaný riadenou depolymerizáciou sodnej soli heparínu z črevnej sliznice prasaťa pôsobením kyseliny dusitej. Výrobcom je Kabi Pharmacia, Švédsko, Fragmin^{R} je určený ako antitrombotický prostriedok vo forme roztoku v roztokoch chloridu sodného a dodáva sa v injekčných striekačkách na jedno použitie v dávkach 2500 IU (medzinárodných jednotiek)/0,2 ml a 5000 IU/0,2 ml, čo zodpovedá dávke 16 a 32 mg účinnej látky.

Fraxiparin^{R} a Fraxiparine^{R} sú LMWH so strednou molekulovou hmotnosťou približne 4500 a je možné ich získať frakcionáciou alebo riadenou depolymerizáciou kyselinou dusitou, východiskovým materiálom je vápenatá soľ heparínu z črevnej sliznice prasaťa. Výrobcom je Sanofi (Choay Laboratories) a látky sú určené na použitie ako antitrombotické látky v jednotlivej dávke približne 36 mg, čo zodpovedá 3 075 IU/0,3 ml vody.

Lovenox^{R} (Enoxaparin/e) je fragment LMWH, ktorý je možné získať depolymerizáciou sodnej soli heparínu z črevnej sliznice prasaťa za použitia beta-eliminácie. Výrobcom je Pharmuka SF, Francúzsko, distribuuje Rhône-Poulenc pod názvom Clexane^{R} a Lovenox^{R} na použitie ako antitrombotické látky po jednotlivých dávkach v injekčných striekačkách s obsahom 20 mg/0,2 ml a 40 mg/0,4 ml vody.

Ako je v priebehu prihlášky preukázané, sú nové vlastnosti LMWH, ktoré sú opisované, spoločnými vlastnosťami LMWH bez ohľadu na spôsob výroby, na štruktúrne odlišnosti (vzniknuté depolymerizáciou alebo v závislosti na variáciách heparínu, použitého ako východisková látka) a na antikoagulačné účinnosti za predpokladu, že použitý LMWH je schopný inhibície sekrécie TNF-alfa in vitro T-bunkami v kľudovom stave a/alebo makrofágmi ako odpoveď na aktiváciu stykom so špecifickými antigénmi, mitogénmi, rozrušenou ECM alebo jej bielkovinnými zložkami, ako je fibronectín alebo laminín.

Ďalším testom, ktorý je možné použiť na identifikáciu LMWH, ktorý je účinný v zmysle vynálezu je inhibícia experimentálne vyvolanej kožnej reakcie typu oneskorenej hypersenzitivity (DTH), reakcie, závislej na T-lymfocytoch, na rôznych antigénoch (napríklad tetanovom antigéne, bázickej bielkovine myelínu (MBP), čistených derivátoch bielkovín (PPD) alebo oxazolónu). LMWH tiež spôsobuje inhibíciu adhézie T-buniek k ECM a jej bielkovinným zložkám.

LMWH s účinnosťou podľa vynálezu je možné použiť na výrobu farmaceutických prostriedkov, napríklad vo forme vodných roztokov, ktoré môžu obsahovať chlorid sodný, stabilizátory a ďalšie vhodné zložky bez špecifického účinku. Výhodným spôsobom podania je injekčné podanie, najmä podkožné alebo vnútrožilové, účinnú látku je však možné podávať akýmkoľvek iným vhodným spôsobom.

Podľa vynálezu sa LMWH podáva v intervaloch päť až osem

dní, s výhodou raz za týždeň.

Poruchami, ktoré je možné liečiť alebo ktorým je možné predchádzať sú všetky poruchy, ktoré sú spojené s patologickými pochodmi, zahrňujúcimi indukciu sekrécie TNF-alfa, včítane aterosklerózy a vaskulitídy a príbuzných patologických pochodov, ďalej môže ísť o autoimúnne ochorenia, napríklad reumatoidný artritis, diabetes typu I (IDDM), alergiu, odmietnutie transplantátu, akútne a chronické zápalové ochorenie, ako uveitis, zápal časti hrubého čreva, anorexia nervosa, hemoragický šok, spôsobený septikémiou a tiež o ochorenie AIDS. V prípade AIDS môže LMWH potlačiť replikáciu vírusu HIV a/alebo podporiť odolnosť proti bežným infekciám a tým aj zabrániť vzniku komplexu, spojeného s AIDS (ARC).

Bolo pozorované, že LMWH môže mať úzke rozmedzie účinnosti dávok a že rôzne prípravky s obsahom LMWH môžu mať rôzne optimálne biologické účinky. Bolo preto nevyhnutné vytvoriť jednotku pre prípravky s obsahom LMWH, založenú na biologickej skúške na inhibíciu sekrécie TNF-alfa bunkami myšej sleziny u myší, liečených LMWH alebo na biologickej skúške na inhibíciu DTH reaktivity pôsobením LMWH. Bolo preukázané, že schopnosť určitej dávky LMWH spôsobiť inhibíciu sekrécie TNF-alfa je v pozitívnej korelácii so schopnosťou spôsobiť inhibíciu reakcie typu oneskorenej hypersenzitivity (DTH). Táto bunkovo sprostredkovaná zápalová reakcia in vivo je dôležitá vzhľadom na to, že je vyjadrením pochodu, ktorý sa zúčastňuje vzniku autoimúnnych ochorení, odmietnutia transplantátu, niektorých typov zápalových ochorení krvných ciev a vzniku niektorých alergií.

Bolo preto stanovené, že na účely vynálezu sa najnižšia dávka LMWH na kg hmotnosti, ktorá spôsobuje inhibíciu produkcie TNF-alfa alebo inhibíciu reaktivity typu DTH aspoň na 50 % považuje za dávku, obsahujúcu 12 myších inhibičných jednotiek/kg (12 u/kg). Vzhľadom na rozdiely medzi povrchom tela a metabolizmom u myší a u človeka by u ľudí malo byť

použitých nižších dávok LMWH a 12 u/kg pre myš teda zodpovedá 1 u/kg pre človeka. Napríklad dávka prostriedku Fragmin^{R}, šarža 38609, účinná pri inhibícii sekrécie TNF-alfa a reaktivity typu DTH je 5 µg pre myš raz za týždeň. Vzhľadom na to, že každá myš váži približne 25 g, dávka Fragminu^{R} 38609 12 jednotiek na kg zodpovedá 200 µg/kg myši. Dávka, vhodná pre človeka je teda 200 µg/kg : 12 = 16,67 µg/kg. Človeku s hmotnosťou 70 kg by teda malo byť podaných 1,2 mg v jednej dávke podkožne každých 7 dní. Vzhľadom na to, že sa jednotlivci biologicky značne od seba líšia, môže sa optimálna dávka líšiť od uvedenej dávky 1,2 mg a bude sa pohybovať pod 5 mg, zvlášť v rozmedzí 0,3 až 3 mg.

Dávka LMWH, ktorá by mala byť účinná u potkanov môže byť odvodená na základe skutočnosti, že dávka pre potkana je polovicou dávky pre myš, to znamená 6 jednotiek/kg. Napríklad v prípade, že 12 jednotiek Fragminu^{R} šarže 38609 je 200 µg/kg, potom dávka 6 jednotiek, vhodná pre potkana je 100 µg/kg alebo 20 µg pre potkana s hmotnosťou 200 g, táto dávka sa opäť podáva raz týždenne.

Praktické vykonanie vynálezu bude ďalej vysvetlené nasledujúcimi príkladmi.

Príklady uskutočnenia vynálezu

P r í k l a d 1

Biologická skúška na inhibíciu sekrécie TNF-alfa

Supernatanty slezinných buniek, pestovaných v prítomnosti alebo v neprítomnosti LMWH alebo slezinné bunky, získané z myší, ktoré boli alebo neboli in vivo liečené LMWH boli analyzované na svoju schopnosť vylučovať TNF-alfa. Biologická skúška na TNF-alfa je založená na cytotoxickom účinku TNF-alfa na cykloheximidom (CHI)-senzitizované bunky a je možné ju vykonávať kvantitatívne na základe príjmu neutrál-

nej červene spôsobom podľa publikácie Wallach D., J. Immunology, 1984, 132:2464 až 2469. Postupuje sa tak, že sa stanoví počet CHI-senzitizovaných HeLa buniek, ktoré uhynuli pôsobením TNF-alfa, prítomného v supernatante v porovnaní s titračnými krivkami pre exogénne pridávaný TNF-alfa. Životnosť buniek sa stanoví ich schopnosťou prijímať neutrálnu červeň tak, že sa bunky s týmto farbivom inkubujú dve hodiny, potom sa prebytočné farbivo vymyje, neutrálna červeň, prijatá bunkami sa extrahuje zmesou Sorensonovho citrátového pufra a etanolu a výsledok sa merá kolorimetricky pri 570 nm pomocou automatického zariadenia Microelisa Autoreader.

Bunky z myší, ktorým bol podávaný LMWH boli získané nasledujúcim spôsobom: Myšie samice kmeňa Balb/c (25 gramov, vo veku 2 mesiacov), aspoň 5 myší v skupine boli ošetrené podkožným podaním rôznych dávok LMWH, obvykle v rozmedzí 0,5 až 20 µg/myš. Po ďalších piatich dňoch boli myši usmrtené oddelením hlavy, sleziny boli vybraté, zbavené červených krviniek a analyzované na produkciu TNF-alfa ako odpovede na indukciu dECM, Concavalinom A (Con A) alebo lipopolysacharid (LPS).

P r í k l a d 2

Biologická skúška na inhibíciu reaktivity typu DTH

Skupiny myší boli senzitizované na vyholenú pokožku brucha za použitia 100 µl 3% oxazolónu (OX) v zmesi acetónu a olivového oleja v objemovom pomere 4:1. Senzitivita typu DTH bola vyvolaná po 5 dňoch tak, že myšiam bolo aplikovaných na každú stranu ucha 10 µl 0,5% OX v zmesi acetónu a olivového oleja, celkom 20 µl tejto látky. Oblasť ucha bola zmeraná tesne pred podávaním a potom 24 a 48 hodín po podaní Mitutoyovým technickým mikrometrom. Meranie opuchu ucha sa potom vyjadruje ako prírastok (delta) opuchu v priemernej hodnote pre skupinu v jednotkách 10^{-2} mm alebo 10^{-4} palca (± štandardná chyba) v závislosti na použitom mikrometri.

Inhibícia v % sa vypočíta podľa nasledujúceho vzťahu:

$$\text{inhibícia v \%} = \frac{\text{pozitívna kontrola - pokusná skupina}}{\text{pozitívna kontrola - negatívna kontrola}} \times 100$$

Myšiam sa podáva LMWH rovnakým spôsobom ako v príklade 1 injekčne 1 deň pred primárnou senzitizáciou na OX. Piaty deň po senzitizácii na OX sa rovnakým spôsobom, ako je vyššie opísané, pridá OX na vyvolanie DTH-reakcie.

Pozitívnou kontrolou je DTH-reakcia, vyvolaná u imunizovaných myší, ktorým nebol podávaný LMWH. Negatívnou kontrolou je opuch, vyvolaný antigénom u imunizovaných myší.

P r í k l a d 3

Indukcia sekrécie TNF-alfa T-bunkami a makrofágmi in vitro

Mikrotitračné platne boli pripravené nasledujúcim spôsobom: fibronectín (FN) alebo laminín (LN) (Sigma) boli uložené na ploché dno vyhĺbení platní s 96 vyhĺbeniami (Costar pri koncentrácii 1 µg/50 µl PBS v jednom vyhĺbení a po 16 hodinách bol materiál odstránený, Zostávajúce väzné miesta boli blokované BSA/PBS (10 mg/ml), roztok bol pridaný do vyhĺbení na 2 hodiny a potom bol vymytý. Vyhĺbenia, vybavené povlakom ECM boli pripravené nasledujúcim spôsobom: endoteliálne bunky rohovky hovädzieho dobytka boli pestované na plochých dnách platní s 96 vyhĺbeniami. Súvislá vrstva endoteliálnych buniek bola rozpustená, zostal neporušený materiál ECM, zbavený bunkovej drviny (Gospodarowicz D. a ďalší, J. Biol. Chem. 1987, 253:3736). Rozrušená extracelulárna matrica (dECM) bola pripravená trikrát jemným oškrabaním ECM injekčnou ihlou 27G a takto upravený povrch bol vybavený povlakom BSA/PBS. Potkanie klonované bunky $CD4^+T$ v kľudovom stave, označené K1, ktoré rozpoznávajú bázickú bielkovinu myelínu (MBP) boli namnožené a udržované v kultúre a potom

pridané do vyhĺbení v množstve 10^5 na jedno vyhĺbenie za pridania alebo bez pridania 3 x 10^5 syngenických slezinných makrofágov v 100 µl prostredia RPMI 1640 (Gibco) na jedno vyhĺbenie, prostredie je doplnené 1 % BSA a antibiotikami. Slezinné makrofágy boli čistené odstránením buniek T a B za použitia špecifických monoklonálnych protilátok (mAb). Tam, kde to bolo označené, boli do vyhĺbení pridané protilátky TNF-alfa-mAb proti myším tkanivám v riedení 1/300 (Genzyme). Tam, kde je to takisto uvedené, boli do vyhĺbení pridané MBP (100 µg/ml), ConA (2,5 µg/ml) alebo LPS (1 µg/ml). Potom boli platne inkubované pri teplote 37 °C vo vlhkej atmosfére v inkubátore celkom 3 hodiny. Obsah vyhĺbení (4 vyhĺbenia na 1 pokusnú skupinu) bol potom odobraný, materiál bol odstredený a prostredie bolo podrobené skúškam na sekréciu TNF-alfa rovnako ako v príklade 1. Supernatanty pestovaných makrofágov a lymfocytov boli pridané ku kultúram HeLa buniek, ktoré sú na TNF-alfa citlivé a uhynutie buniek v prítomnosti skúmaného prostredia bolo kalibrované porovnaním a titračnou krivkou, získanou pri použití exogénne pridávaného TNF-alfa. Uhynutie buniek bolo sledované na základe uvoľnenia neutrálnej červene z vopred inkubovaných HeLa buniek. Uvádzané výsledky reprezentujú údaje, získané v priebehu šiestich pokusov, pri ktorých boli dosiahnuté v podstate rovnaké výsledky.

Tabuľka 1 ukazuje, že u T-buniek a u makrofágov je možné indukovať sekréciu TNF-alfa stykom so špecifickým antigénom MBP (skupina 4), mitogénom ConA (skupina 6) alebo LPS (skupina 8). Avšak v neprítomnosti antigénneho alebo mitogénneho stimulu je možné indukovať sekréciu TNF-alfa aj rozrušenou extracelulárnou matricou (dECM, skupina 10) alebo zložkami ECM fibronectínom (FN, skupina 12) alebo laminínom (LN, skupina 14). Neporušená ECM indukovala produkciu TNF-alfa len slabo (skupina 16).

T a b u ľ k a 1

Sekrécia TNF-alfa bunkami T a makrofágmi po indukcii špecifickými antigénmi MBP, Con A, LPS alebo zložkami dECM

Skupina	Induktor sekrécie TNF-alfa	Bunky K1, pestované spolu s (áno) alebo bez (nie) makrofágov	Sekrécia TNF-alfa v pg/ml
1	žiadny	nie	50
2		áno	65
3	antigén MBP	nie	30
4		áno	950
5	Con A	nie	120
6		áno	1300
7	LPS	nie	50
8		áno	1500
9	dECM	nie	30
10		áno	900
11	FN	nie	20
12		áno	650
13	LN	nie	50
14		áno	500
15	ECM	nie	30
16		áno	120

P r í k l a d 4

Riadenie sekrécie TNF-alfa pomocou LMWH

T-bunky a ďalšie bunkové kultúry boli pripravené spôsobom podľa príkladu 3. LMWH bol pridaný do vyhĺbení na začiatku pestovania bunkovej kultúry. Úroveň TNF-alfa bola sledovaná po 3 hodinách inkubácie.

V tabuľke 2 je ukázané, že prítomnosť LMWH (Fragmin^{R},

šarža 38609) in vitro spôsobuje inhibíciu sekrécie TNF-alfa špecifickými antigénmi (MBP, skupina 4), mitogénmi (Con A a LPS, skupina 6 a 8), dECM alebo zložkami ECM (skupiny 10, 12 a 14). Vzhľadom na to, že sekrécia TNF-alfa, indukovaná ECM sa zrejme zúčastňuje vzniku aterosklerózy, bolo by žiaduce v tomto prípade dosiahnuť inhibíciu TNF-alfa pôsobením LMWH.

T a b u ľ k a 2

Indukcia TNF-alfa in vitro môže byť inhibovaná pôsobením LMWH (Fragmin^{R}, šarža 38609)

Skupina	Induktor sekrécie TNF-alfa	LMWH 1 µg/ml	Sekrécia TNF-alfa kultúrou T-buniek a makrofágov (pg/ml)
1	žiadny	nie	65
2		áno	30
3	antigén MBP	nie	950
4		áno	60
5	Con A	nie	1300
6		áno	80
7	LPS	nie	1500
8		áno	80
9	dECM	nie	900
10		áno	90
11	FN	nie	650
12		áno	90
13	LN	nie	500
14		áno	70

P r í k l a d 5

Aby bolo možné dokázať vplyv LMWH, podávaný myšiam in vivo na sekréciu TNF-alfa slezinnými bunkami in vitro, bol

vykonaný nasledujúci pokus. Myšiam BALB/c v skupinách po piatich boli podávané rôzne dávky LMWH (Fragmin^{R}, šarža 38609) podkožne vo fyziologickom roztoku chloridu sodného. Po jednom týždni boli zvieratá usmrtené a ich slezinné bunky, zbavené červených krviniek, boli sledované na schopnosť vylučovať TNF-alfa ako odpoveď na kontrolné vyhĺbenia bez obsahu dECM (A) alebo na vyhĺbenia, vybavené povlakom dECM (B). Meranie sekrécie TNF-alfa bolo vykonané spôsobom, uvedeným v príklade 1. V tabuľke 3 sú uvedené výsledky, ktoré ukazujú, že injekcia 5 µg LMWH, podaná raz a to pred 7 dňami, spôsobí inhibíciu sekrécie TNF-alfa po indukcii dECM. Vyššie alebo nižšie dávky LMWH boli menej účinné. To znamená, že účinná bola optimálna dávka LMWH, podaná in vivo týždeň pred skúškou.

T a b u ľ k a 3

Inhibícia sekrécie TNF-alfa T-bunkami ex vivo po vyvolaní tejto sekrécie pôsobením dECM

	liečenie myší BALB/c LMWH (týždenne)	sekrécia TNF-alfa in vitro v pg/ml, pestovaných na prostredí s pridaním A) - B) dECM (inhibícia v %)		
1	-	30	400	
2	0,5 µg	50	380	(5)
3	1,0 µg	25	90	(78)
4	5,0 µg	25	60	(85)
5	10,0 µg	30	140	(65)
6	20,0 µg	40	320	(20)

V nasledujúcej tabuľke 4 je ukázané, že dávka 5 µg LMWH (Fragmin^{R}, šarža 38609) bola taktiež účinná pri inhibícii sekrécie TNF-alfa po jej indukcii LPS. Myšiam BALB/c (4 myši v pokusnej skupine) bolo podané uvedené množstvo LMWH vo fyziologickom roztoku chloridu sodného podkožnou injekciou. Po

jednom týždni bolo myšiam intraperitoneálne podané 10 mg LPS, po 4 hodinách boli myši usmrtené a ich slezinné bunky, zbavené červených krviniek, potom boli pestované vo vyhĺbeniach, vybavených povlakom dECM 3 hodiny v inkubátore s vysokou vlhkosťou. Množstvo TNF-alfa, vylučovaného ako odpoveď na dECM bolo potom merané v supernatantoch kultúry. Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 4.

T a b u ľ k a 4

Podanie LMWH myšiam spôsobí inhibíciu sekrécie TNF-alfa makrofágmi po jej vyvolaní pôsobením LPS

liečenie myší podaním LMWH (μg)	Sekrécia TNF-alfa in vitro makrofágmi (pg/ml) po pôsobení LPS	Inhibícia v %
0	690	-
0,1	500	28
1	350	50
5	120	82
20	550	20

P r í k l a d 6

Aby bolo možné sledovať vplyv rôznych typov LMWH na inhibíciu sekrécie TNF-alfa a na odpoveď typu DTH, boli myšiam podkožne podávané v rôznej koncentrácii uvedené typy LMWH. Po jednom týždni boli niektoré myši usmrtené a bola meraná indukcia sekrécie TNF-alfa ako odpoveď na aktiváciu pomocou Con A in vitro. Zostávajúce myši boli sledované na svoju schopnosť reagovať na podanie antigénu oxazolónu. Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 5 ako percentuálna inhibícia v porovnaní s odpoveďou myší, ktorým nebol podávaný LMWH.

Pri analýze výsledkov uvedených v tabuľke 5 je možné urobiť nasledujúce závery:

1) Pre rôzne šarže LMWH, z ktorých každá je kalibrovaná na dosiahnutie porovnateľného antitrombotického účinku (skúšky s faktorom X) je možné pozorovať rôzne optimálne dávky v prípade, že tieto šarže sú použité na inhibíciu sekrécie TNF-alfa. Existujú však typy LMWH, napríklad Clexane^{R}, šarža 4096, ktoré nemajú vôbec žiadny inhibičný účinok na TNF-alfa a jeho sekréciu v akejkoľvek podanej dávke. Je preto možné urobiť záver, že antitrombotický účinok rôznych typov LMWH nijako nesúvisí so schopnosťou tohto typu LMWH spôsobiť inhibíciu TNF-alfa. Obidve od seba odlišné biologické skúšky sa teda týkajú javov, sprostredkovaných odlišnými faktormi, ktoré sú v týchto typoch látok prítomné.

2) Schopnosť určitej dávky LMWH spôsobiť inhibíciu sekrécie TNF-alfa je v pozitívnej korelácii so schopnosťou vyvolať inhibíciu reakcie typu DTH a dávka, ktorá je optimálna na inhibíciu sekrécie TNF-alfa je taktiež optimálna v prípade inhibície reakcie typu DTH.

T a b u ľ k a 5

Pri podaní rôznych typov LMWH myšiam, dochádza k inhibícii sekrécie TNF-alfa a odpovedi typu DTH ex vivo

Typ LMWH podávaný myšiam	Koncentrácia µg/myš	Sekrécia TNF-alfa vyvolaná Con A ex vivo		Reakcia typu DTH	
		pg/ml	inhibícia %	DTH	inhibícia %
Fragmin					
š. 38609	-	450	-	25	-
	0,5	425	5	21	12
	1	400	12	23	10
	5	68	85	6	73
	10	350	22	20	20
	50	435	8	26	0
š. 45389	-	320	-	28	-
	0,1	280	13	26	6
	1	70	78	4	89
	5	260	18	24	13
	10	290	10	26	6
	50	310	4	29	0
Clexane					
š. 2088	-	400	-	22	-
	0,1	360	10	17	23
	1	64	84	3	87
	5	152	38	13	0
	10	380	4	23	0
š. 2066	-	350	-	23	-
	0,1	338	6	20	13
	1	185	54	8	65
	5	192	57	7	70
	10	186	55	7	70
š. 4096	-	320	-	24	-
	1	335	0	27	0
	5	325	0	26	0
	10	330	0	24	0

P r í k l a d 7

Liečenie adjuvantnej artritídy (AA) u potkanov nízkymi dávkami LMWH

Adjuvantný artritis je pokusné ochorenie, ktoré je možné u niektorých kmeňov potkanov vyvolať imunizáciou antigénmi Mycobacterium tuberculosis podľa publikácie Pearson C. M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 91:91. Toto experimentálne ochorenie je považované za model ľudskej reumatoidnej artritídy podľa publikácie Pearson C. M., Arthritis Rheum., 1964, 7:80. Artritída je pravdepodobne vyvolaná T-lymfocytmi, ktoré rozpoznávajú antigén M. tuberculosis so skríženou reaktivitou so štruktúrami spojivového tkaniva (Cohen I. R. a ďalší, Arthritis Rheum., 1985, 28:841).

Lewisove potkany boli imunizované M. tuberculosis (1 mg) v oleji na vyvolanie adjuvantnej artritídy podľa Pearson C. M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 91:91. Po piatich dňoch bola potkanom podkožne podaná dávka LMWH a/alebo heparínu a bol pozorovaný vznik artritídy za použitia stupnice 0 až 16 tak, ako bolo opísané v publikácii Holoshitz Y. a ďalší, Science, 1983, 219:56. Všetky pokusy boli vykonané s prostriedkom Fragmin^{R}, šaržou 38609.

Možnosť praktického použitia farmaceutického prostriedku podľa vynálezu bude ďalej vysvetlená v súvislosti s výsledkami biologických pokusov, ktoré sú zhrnuté na priložených výkresoch.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obr. 1 je znázornený vplyv LMWH na vznik experimentálnej artritídy.

Na obr. 2 je znázornený účinok dávky 20 µg Fragminu^{R} na priebeh experimentálnej artritídy (adjuvantnej artritídy AA).

Na obr. 3 je znázornené porovnanie účinku 20 µg Fragminu^{R} alebo heparínu raz týždenne na AA.

Na obr. 4 je znázornený účinok dávky 20 µg Fragminu^{R} alebo heparínu na AA pri dennom podaní.

Na obr. 5 je znázornený účinok podávania rôznych typov LMWH na AA v dávke 20 µg v rôznych intervaloch.

Na obr. 6 je znázornený vplyv 20 µg Fragminu^{R} na odmietnutie transplantátu u potkanov.

Na obr. 7 je znázornený účinok LMWH u myší na diabetes typu I (IDDM) závislý na inzulíne.

Na obr. 8 je znázornený účinok LMWH na reaktivitu typu DTH u ľudského dobrovoľníka.

Aby bolo možné stanoviť závislosť odpovede na dávke Fragminu^{R} (obr. 1), bolo potkanom, imunizovaným na vyvolanie AA, podkožne raz týždenne podané, počínajúc piatym dňom po injekcii 0,5 µg (o), 1 µg (♦), 2 µg (•), 10 µg (◊), 15 µg (△), 20 µg (■), 30 µg (▲), 40 µg (x), ako kontrola slúžilo podanie PBS (□). Podávanie veľmi účinne bránilo vzniku experimentálnej artritídy.

Účinok dávky 20 µg Fragminu^{R} na priebeh AA je znázornený na obr. 2, kde jednotlivé krivky majú nasledujúci význam: kontrola PBS (□), jediné podanie 5. deň (▲), denné podávanie (●), podávanie každý piaty deň (o), podávanie raz týždenne (■). Je zrejmé, že k inhibíciu artritídy dochádza pri podávaní Fragminu^{R} v intervale 5 dní a 7 dní.

Na obr. 3 je znázornený účinok podávania Fragminu^{R} (šarža 38609) raz týždenne v porovnaní s podávaním štandardného heparínu na AA. Lewisove potkany boli imunizované na vyvolanie AA. Od 5. dňa bola podkožne v týždenných intervaloch potkanom podávaná dávka 20 µg Fragminu^{R} (●), heparínu (o) alebo fyziologického roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrom (PBS)) (□) ako kontrola. Výsledky dokazujú dramatický rozdiel v účinnosti medzi Fragminom^{R} a bežným heparínom. Pri podávaní Fragminu^{R} došlo k úplnej inhibícii vzniku

artritídy, kým heparín nemal žiadny inhibičný účinok.

Žiadny inhibičný účinok nebolo možné pozorovať pri každodennom podávaní dávky 20 µg LMWH, hoci pri tomto spôsobe podávania bol účinok bežného heparínu silnejší než účinok Fragminu^{R}, ako je zrejme z obr. 4. Jednotlivé krivky: Fragmin^{R} (šarža 38609) (●), heparín (o), PBS ako kontrola (□).

Podobný inhibičný účinok bolo možné pozorovať pri použití niekoľkých iných typov LMWH pri ich podávaní Lewisovým potkanom, imunizovaným na vyvolanie AA. Na obr. 5 sú uvedené výsledky injekčného podania dávky 20 µg Fraxiparinu^{R} a to denne (□), raz týždenne (■), okrem toho bol podávaný Fraxiparine^{R} a to taktiež denne (Δ) a raz týždenne (▲), Lovenox^{R}/Clexane^{R} denne(●) a raz týždenne (o) a ako kontrola PBS (x). Pri podávaní všetkých troch typov LMWH, navzájom od seba odlišných, bolo možné pozorovať výraznú inhibíciu vzniku artritídy pri podávaní raz týždenne, avšak nie pri podávaní raz denne.

P r í k l a d 8

Podávaním LMWH je možné zabrániť odmietnutiu transplantátov

Potkanom kmeňa Wistar boli voperované alogénne BN transplantáty srdca (Ono K. a Linsay E. S., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 1969, 45:225 až 229). Odo dňa pred transplantáciou bola potkanom podkožne v intervaloch 7 dní podávaná dávka 20 µg Fragminu^{R} alebo PBS ako kontroly (obr. 6. krivky ■ a □). Potom bolo zaznamenávané prežívanie potkanov. Deň odmietnutia transplantátu bol stanovený ako deň, v ktorom transplantované srdce prestalo biť podľa hmatového vyšetrenia cez brušnú stenu. Z obr. 6 je zrejmé, že potkany, ktorým bola v intervale jeden týždeň podávaná dávka LMWH, mali významne dlhšiu dobu prežívania transplantátov.

P r í k l a d 9

Biologické účinky LMWH u myší NOD na diabetes mellitus, závislý na inzulíne (IDDM)

U myší, kmeňa NOD sa spontánne vyvíja diabetes mellitus typu I, závislý na inzulíne (IDDM), ide o uznávaný model pre ľudské ochorenie IDDM podľa Castano L. a Eisenbarth G. S., Annu. Rev. Immunol. 1990, 8:647 až 679. Ochorenie začína vo veku 4 až 5 týždňov zápalovými zmenami na ostrovčekoch, t.j. ako insulitis. Táto insulitis postupne ničí beta-bunky, produkujúce inzulín, ktoré sú citlivé na poškodenie TNF-alfa. Vo veku približne 4 až 5 mesiacov je už rozrušené dostatočné množstvo beta-buniek na to, aby došlo k prejavom diabetu.

Aby bolo možné zistiť, či je možné podávaním LMWH ovplyvniť priebeh IDDM, bola skupine 10 myších samíc NOD raz týždenne podkožne podávaná dávka 5 µg Fragminu^{R} (šarža 38609) na myš, čo zodpovedá dávke 12 myších jednotiek/kg. Skupine 10 kontrolných myší bol podkožne podávaný fyziologický roztok chloridu sodného. Vo veku 5 mesiacov bola všetkým myšiam odobraná krv na stanovenie vývoja IDDM za použitia štandardného postupu podľa publikácie Elias D. a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:1576 až 1580. Z obr. 7 je zrejmé, že kontrolné myši bez podania účinnej látky mali abnormálnu koncentráciu glukózy v krvi (400 mg/dl). Oproti tomu bola u myší, liečených LMWH nameraná normálna koncentrácia glukózy v krvi (100 mg/dl). Je teda zrejmé, že podávaním LMWH je možné priaznivo ovplyvniť priebeh IDDM.

P r í k l a d 10

Liečenie DTH u človeka podávaním LMWH

Na obr. 8 je znázornený výsledok pokusu, v ktorom bol sledovaný dobrovoľník, muž vo veku 40 rokov s hmotnosťou 85

kg na reaktivitu typu DTH za použitia tetanového antigénu (Merieux skin test applicator). Po 24 a 48 hodinách bolo možné pozorovať zatvrdnutie s priemerom 18 mm. Potom bol dobrovoľník liečený podávaním Fragminu^{R} (šarža 38609), boli podané 3 mg tejto látky vo forme podkožnej injekcie. Po ďalších piatich dňoch bola opäť vykonaná skúška na odpoveď typu DTH proti tetanu, bolo možné pozorovať inhibíciu tvorby zatvrdnutia, ktoré v tomto prípade malo priemer len 5 mm. Ďalšia skúška bola vykonaná po ďalších troch týždňoch, v tomto prípade sa reaktivita vrátila na pôvodnú úroveň, po 24 a 48 hodinách sa vytvorilo zatvrdnutie s priemerom 23 mm. Potom bol podaný Fragmin^{R} rovnakým spôsobom ako prvýkrát a po ďalších siedmich dňoch bola znova meraná reaktivita typu DTH. V tomto prípade došlo opäť k inhibícii tvorby zatvrdnutia až na priemer 5 mm. Návrat reaktivity typu DTH bolo možné opäť pozorovať po ďalších troch týždňoch. Výsledok uvedenej skúšky ukazuje, že LMWH v dávke nižšej než 5 mg môže u človeka vyvolať inhibíciu reaktivity typu DTH v prípade, že táto dávka sa podáva v intervaloch 5 alebo 7 dní.

Je zrejmé, že by bolo možné navrhnúť ešte rad modifikácií, takisto patriacich do danej oblasti vynálezu, takže rozsah vynálezu nie je obmedzený na uvedené špecifické vykonania.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Farmaceutický prostriedok na liečenie a/alebo prevenciu patologických stavov, spojených s indukciou sekrécie TNF-alfa, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje farmaceuticky prijateľný nosič a ako účinnú zložku heparín s nízkou molekulovou hmotnosťou LMWH v nízkej účinnej dávke pre podanie v intervaloch 5 až 8 dní, pričom LMWH spôsobuje in vitro inhibíciu sekrécie TNF-alfa T-bunkami v kľudovom stave a/alebo makrofágmi pri odpovedi na antigény, špecifické pre T-bunky, mitogény, aktivátory makrofágov, rozrušenú extracelulárnu matricu (dECM), laminín, fibronectín alebo iné zložky ECM.

2. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje LMWH so strednou molekulovou 3000 až 6000.

3. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je určený na podávanie každý piaty deň.

4. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je určený na podávanie každý siedmy deň.

5. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje LMWH, schopný spôsobiť inhibíciu experimentálne vyvolaných hypersenzitívnych reakcií oneskoreného typu DTH.

6. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je určený na podkožné alebo vnútrožilové podanie.

7. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je určený na oddiale-

nie alebo na prevenciu odmietnutia transplantátu.

8. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je určený na liečenie autoimúnnych ochorení, alergií, zápalových ochorení a ďalších príbuzných patologických stavov.

9. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je určený na liečenie patologických stavov, súvisiacich s AIDS.

10. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je určený na liečenie diabetu typu I, periodontálnych ochorení, zápalových ochorení časti hrubého čreva, uveitídy, reumatických ochorení alebo roztrúsenej sklerózy.

11. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je určený na liečenie reumatoidnej artritídy.

12. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je určený na liečenie chronických zápalových stavov.

13. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je určený na liečenie a/alebo prevenciu aterosklerózy, vaskulitídy a príbuzných patologických pochodov.

14. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje LMWH v jednotlivej nízkej dávke, nižšej než 5 mg.

15. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje LMWH v jedinej nízkej dávke, nižšej než 3 mg.

16. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje LMWH v jedinej nízkej dávke v rozmedzí 0,3 až 3 mg.

17. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje LMWH v jedinej nízkej dávke v rozmedzí 1 až 1,5 mg.

18. Použitie heparínu s nízkou molekulovou hmotnosťou LMWH, schopného spôsobiť inhibíciu sekrécie TNF-alfa T-bunkami v kľudovom stave a/alebo makrofágmi ako odpovede na antigény, špecifické pre T-bunky, mitogény, aktivátory makrofágov, rozrušenú extracelulárnu matricu (dECM), laminín, fibronectín alebo iné zložky ECM na výrobu farmaceutických prostriedkov na podanie v intervaloch 5 až 8 dní na prevenciu a/alebo liečenie patologických stavov, pri ktorých dochádza k indukcii sekrécie TNF-alfa, obsahujúcich nízku účinnú dávku LMWH spolu s farmaceuticky prijateľným nosičom.

19. Použitie podľa nároku 17 na výrobu farmaceutického prostriedku, určeného na podávanie každých sedem dní.

20. Použitie podľa nároku 17 na výrobu farmaceutického prostriedku s obsahom LMWH so strednou molekulovou hmotnosťou 3000 až 6000.

21. Použitie podľa nároku 17 na výrobu farmaceutického prostriedku s obsahom účinnej dávky, nižšej než 5 mg LMWH.

22. Použitie podľa nároku 17 na výrobu farmaceutického prostriedku, určeného na prevenciu a/alebo liečenie odmietnutia transplantátov, alergie, autoimúnnych ochorení a zápalových ochorení.

23. Použitie podľa nároku 17 na výrobu farmaceutického prostriedku na liečenie stavov, spojených s AIDS.

24. Použitie podľa nároku 17 na výrobu farmaceutického prostriedku, určeného na liečenie diabetu typu I, periodontálnych ochorení, zápalových ochorení časti hrubého čreva, uveitídy, reumatických ochorení, chronických zápalov, roztrúsenej sklerózy, aterosklerózy a vaskulitídy.

25. Farmaceutický prostriedok na podanie v intervaloch 5 až 8 dní na prevenciu a/alebo liečenie patologických stavov, spojených s indukciou sekrécie TNF-alfa, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje farmaceuticky prijateľný nosič a heparín s nízkou molekulovou hmotnosťou LMWH, schopný vyvolať inhibíciu experimentálnych hypersenzitívnych reakcií oneskoreného typu DTH na podaný antigén pri dôkaze redukcie zatvrdnutia po aplikácii uvedeného antigénu na kožu päť až sedem dní po podaní farmaceutického prostriedku v porovnaní so zatvrdnutím po podaní antigénu na kožu bez predchádzajúceho podania farmaceutického prostriedku alebo po odznení jeho účinku, pričom farmaceutický prostriedok obsahuje LMWH v nízkej účinnej dávke.

26. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje LMWH so strednou molekulovou hmotnosťou 3000 až 6000.

27. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje LMWH, účinný proti pôsobeniu antigénu zo skupiny tetanus, bázická bielkovina myelínu, čistené deriváty bielkovín a oxazolón.

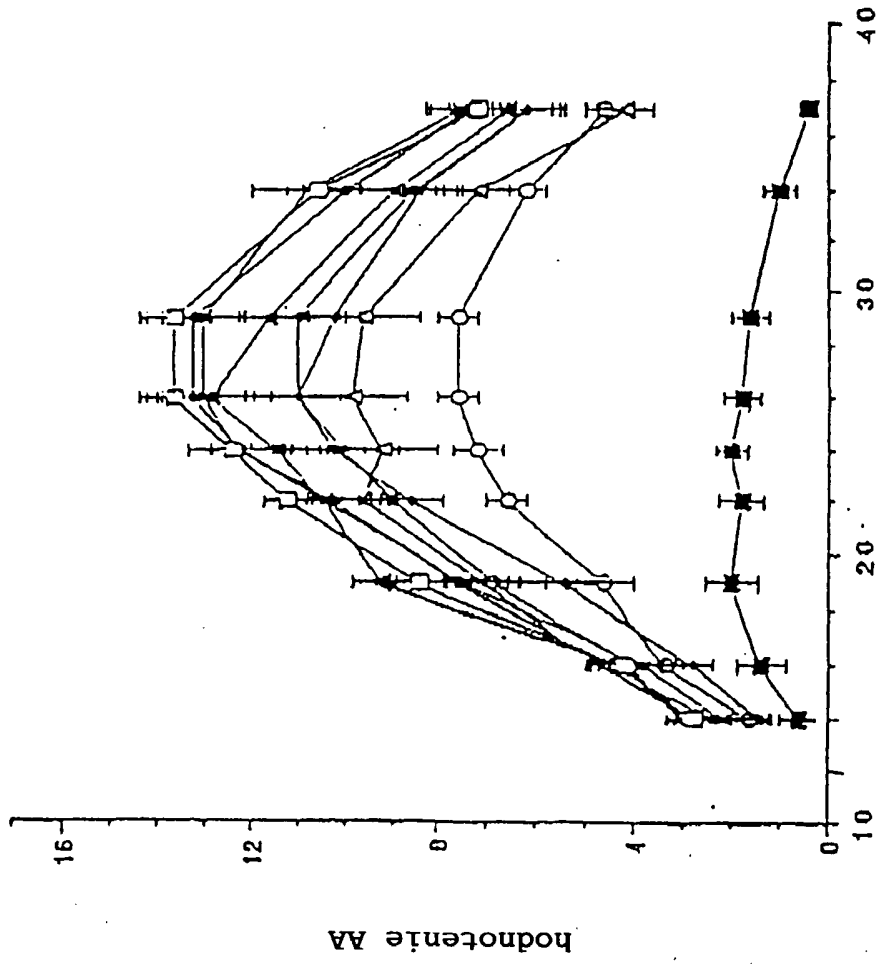
28. Spôsob liečenia chorých trpiacich patologickými stavmi, súvisiacimi s indukciou sekrécie TNF-alfa, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa chorým podáva farmaceutický prostriedok podľa nárokov 1, 2, 25 alebo 26 v intervaloch 5 až 8 dní.

29. Spôsob podľa nároku 28, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že interval medzi podaním je päť dní.

30. Spôsob podľa nároku 28, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že interval medzi podaním je sedem dní.

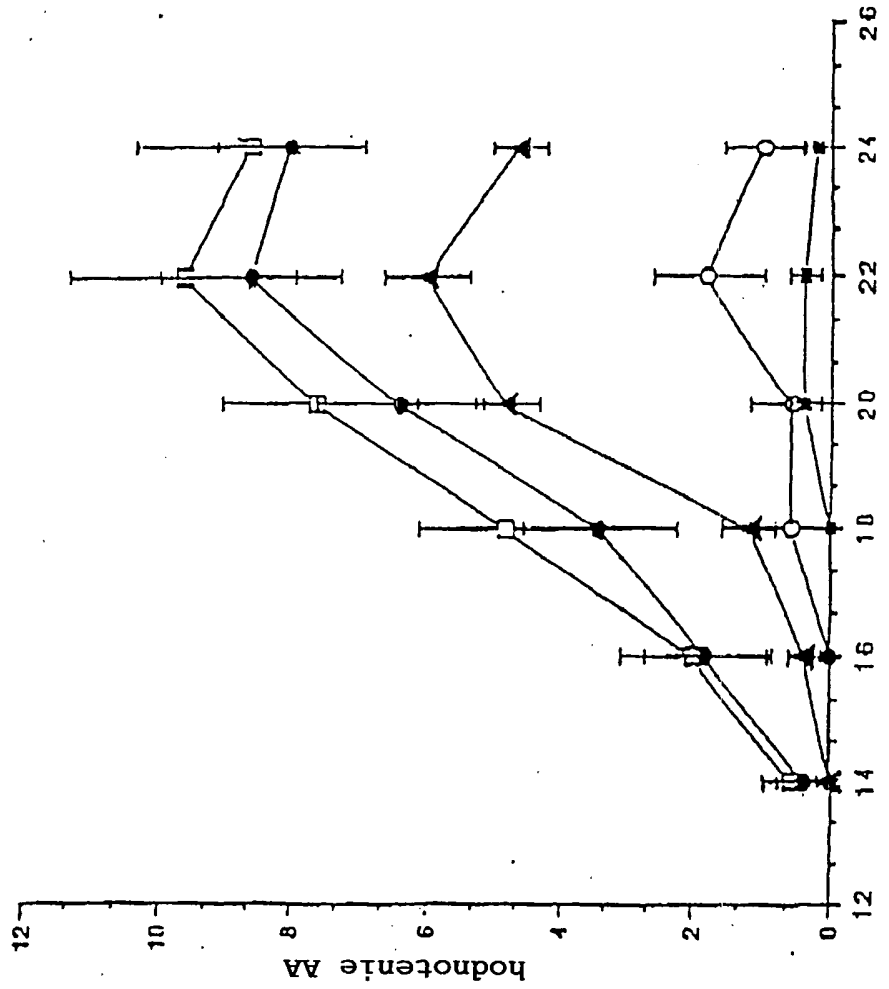
31. Spôsob podľa nároku 28, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že farmaceutický prostriedok obsahuje LMWH v dávke nižšej než 5 mg.

PV 1201 - 93



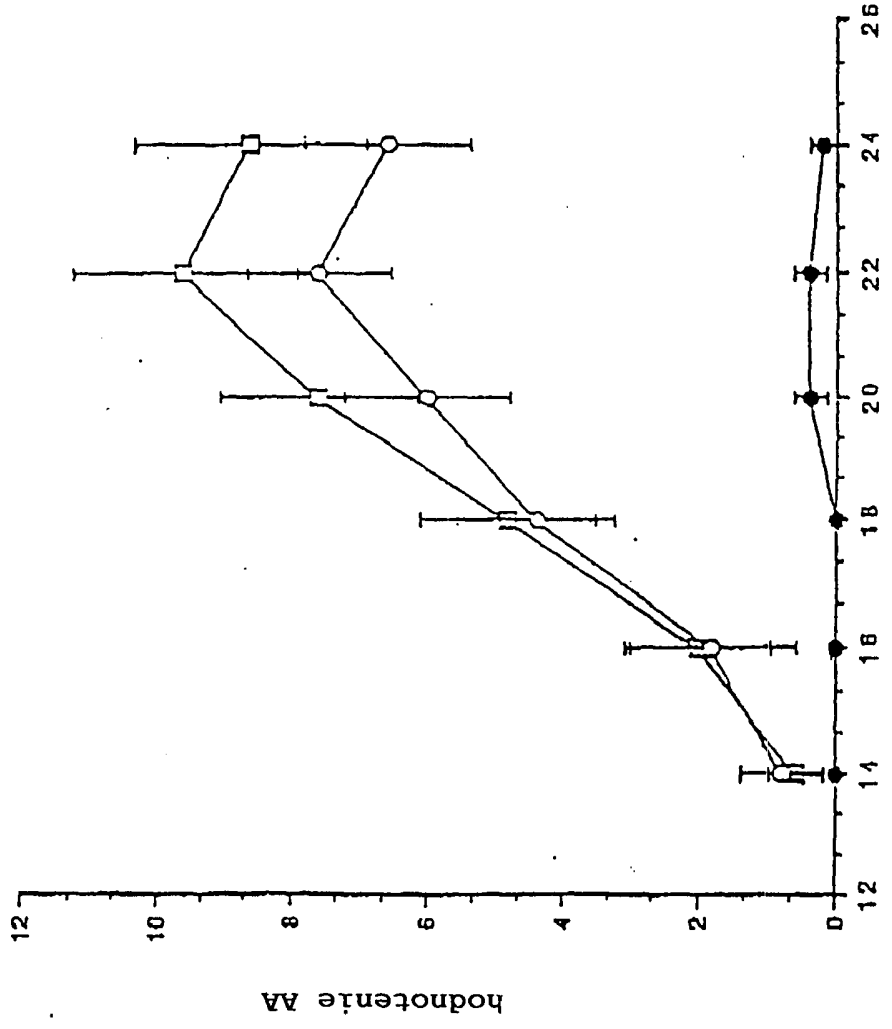
Obr. 1

PV 1201-93



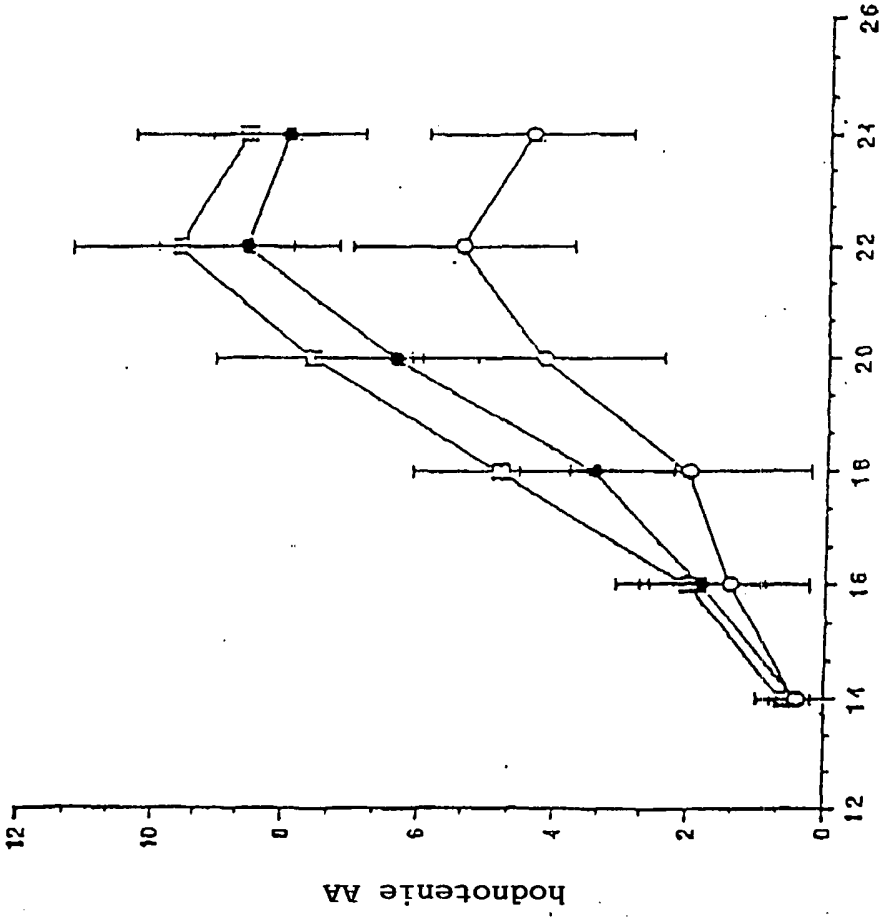
Obr. 2

PV 1201-93



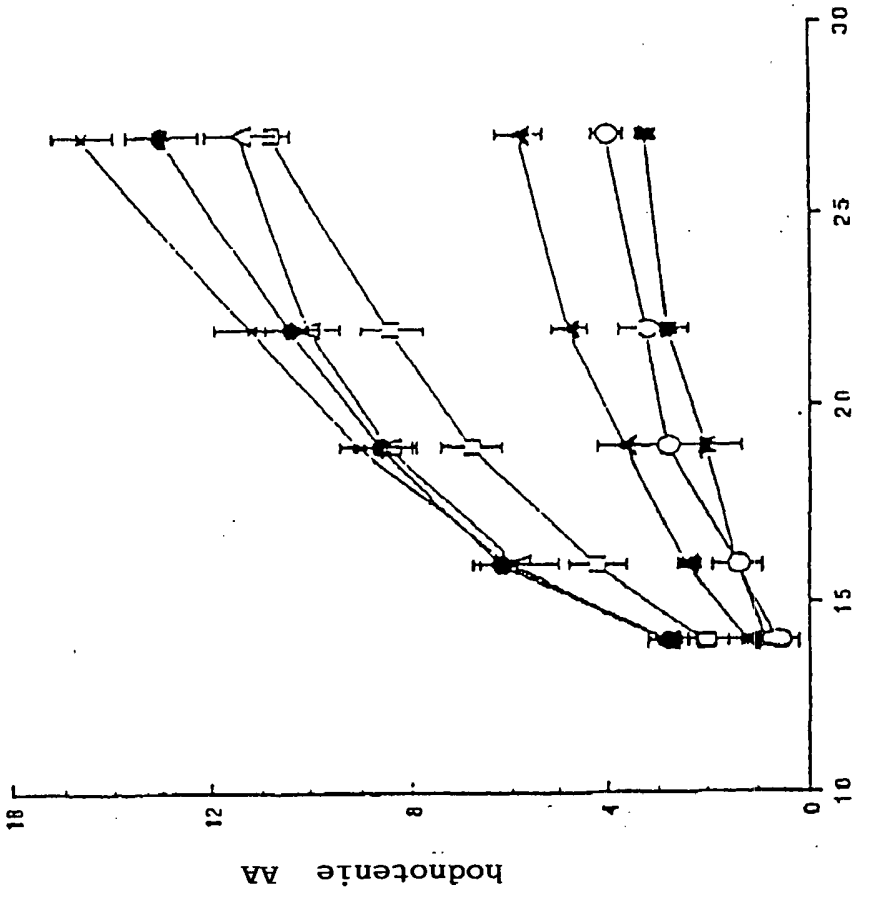
Obr. 3

PV 1201-93



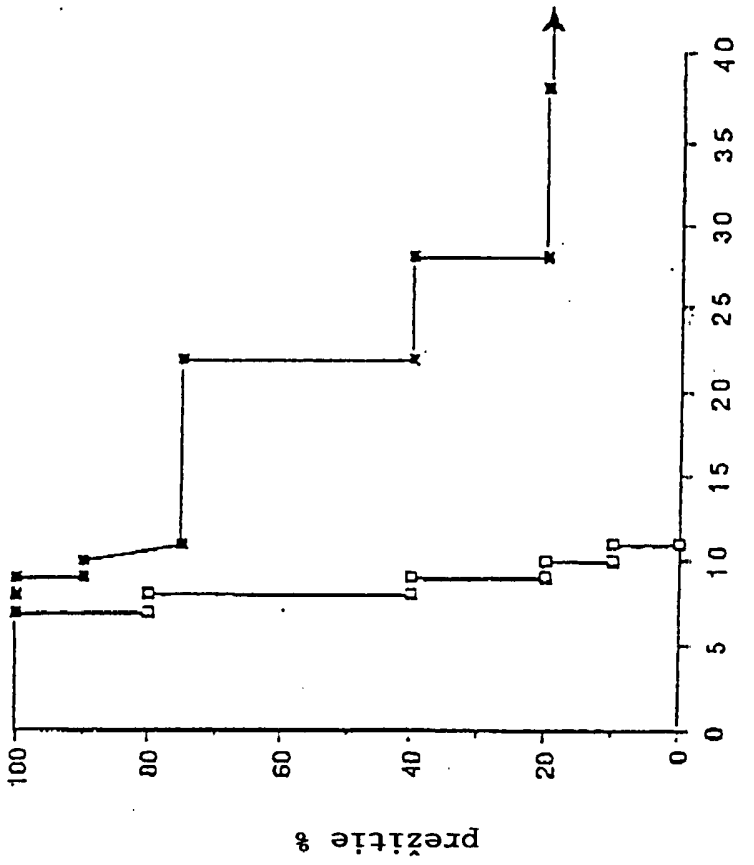
Obr. 4

PV 1201-93



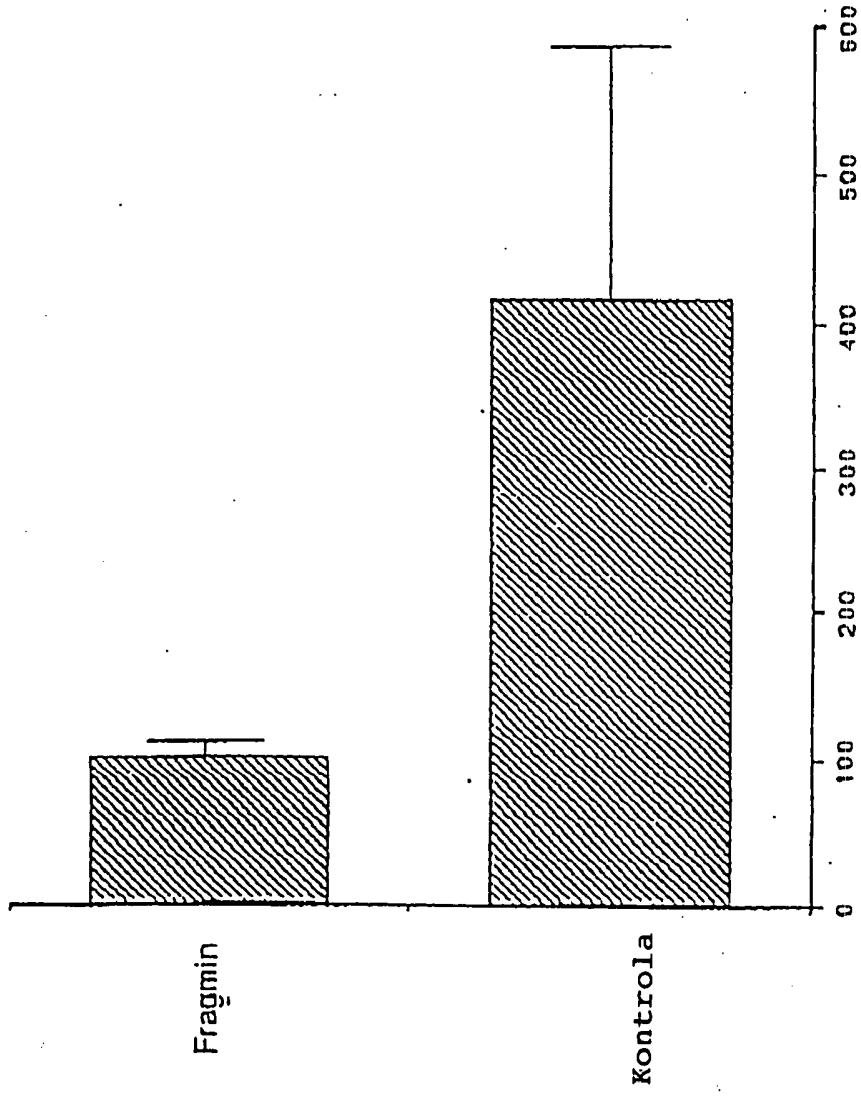
Obr. 5

PV 1201-93



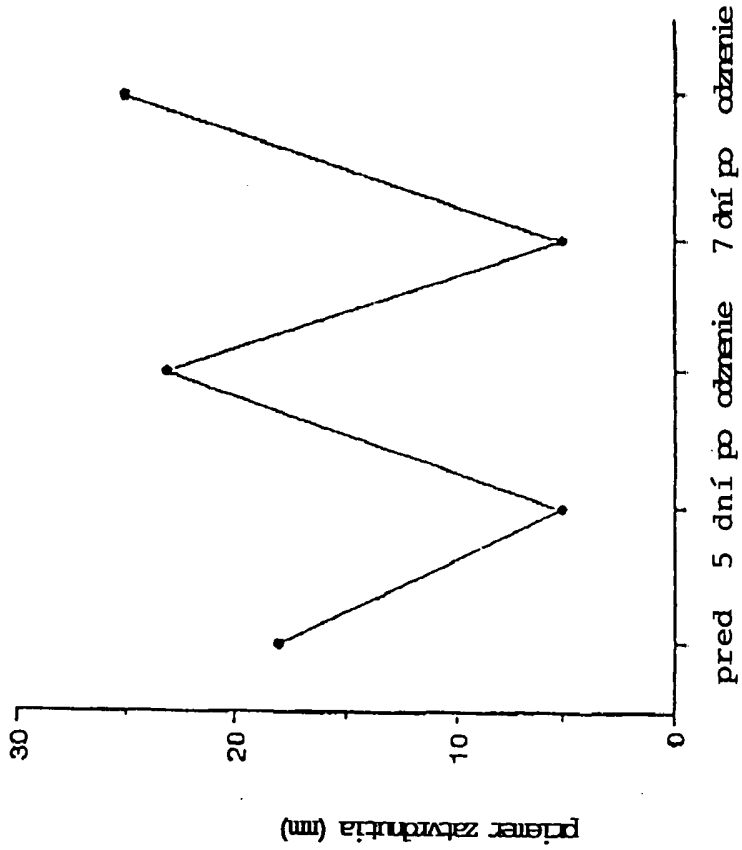
Obr. 6

PV 1201-93



Obr. 7

PV 1201-93



Obr. 8